

Aus dem Institut für Gartenbauwissenschaften der
Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Epidemiologie des *Cherry leaf roll virus* (CLRV):
genetische und serologische Diversität in Abhängigkeit von der
Wirtspflanzenart und der geographischen Herkunft**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Landwirtschaft

(Dr. rer. agr.)

vorgelegt der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

am 05. Juli 2005

von
Kathrin Rebenstorf
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Nagel

Gutachter: 1. Prof. Dr. C. Büttner

2. Dr. C. Obermeier

3. PD Dr. habil. J. Hamacher

vorgelegt am: 05. Juli 2005

Meinen Brüdern Martin, Jörg und Andreas

**So wie man Wasser findet, wenn man gräbt, so findet der Mensch überall das
Unbegreifliche, bald früher, bald später.**

(Georg Christoph Lichtenberg)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Natürliche Verbreitung des CLRV	2
1.2	Molekulare, serologische und biologische Eigenschaften des CLRV	3
1.3	Übertragung des CLRV durch Pollen und Samen	5
1.4	Übertragung des CLRV durch biologische Vektoren	7
1.5	Zielstellung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Pflanzenmaterial und Untersuchungsstandorte.....	10
2.2	Virusisolate	13
2.3	Synthetische Oligonukleotide	16
2.4	Antikörper	17
2.5	Bakterienstämme	18
2.6	Puffer, Lösungen und Nährmedien	18
2.7	Biotest und Indikatorpflanzen	18
2.8	Virusreinigung aus krautigen Indikatorpflanzen.....	19
2.9	Transmissionselektronenmikroskopie	22
2.10	Immunocapture - Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion als Standardnachweis des CLRV	23
2.10.1	Immunocapture - Bindung der Viruspartikel an die Gefäßwand.....	24
2.10.2	Aufschluss virusinfizierten Blattmaterials.....	24
2.10.3	Reverse Transkription zur Erststrang-cDNA-Synthese für CLRV	25
2.10.4	Amplifikation von cDNA-Abschnitten mittels PCR	25
2.10.5	Optimiertes Protokoll zum PCR-Massentest auf CLRV-Infektion.....	26
2.11	IC-RT-PCR zum CLRV-Nachweis in Insekten.....	27
2.12	IC-RT-PCR zur Amplifikation des Hüllproteins von CLRV-Isolaten.....	27
2.13	RT-PCR zur Amplifikation unbekannter Genombereiche.....	28
2.13.1	RT-PCR zur Amplifikation einer 813 bp langen Region in der 3'UTR	28
2.13.2	RT-PCR zur Amplifikation einer 393 bp langen Region in der 3'UTR	30
2.14	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.15	Aufreinigung von PCR-Produkten	31
2.16	Klonierung von DNA in <i>Escherichia coli</i>	31
2.16.1	Ligation von DNA-Fragmenten in einen Plasmid-Vektor.....	31
2.16.2	Herstellung von kompetenten E. coli-Zellen	32
2.16.3	Transformation von Bakterienzellen mit rekombinanter DNA	32

2.16.4	Identifizierung von rekombinanten Transformanden-Kolonien.....	34
2.17	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienzellen	34
2.18	Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten	34
2.19	Sequenzierung.....	35
2.20	Phylogenetische Sequenzanalysen	35
2.21	Subpopulationsdifferenzierung mittels NEI -Koeffizient.....	35
2.22	Korrelationsanalyse mittels Mantel-Test.....	36
2.23	Sekundärstrukturanalyse	37
2.24	Rekombinationsanalyse	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Nachweis von CLRV in Gehölzen und krautigen Pflanzen	40
3.1.1	Nachweis von CLRV in Insekten	43
3.2	Symptomausprägungen an CLRV-infizierten Gehölzen	44
3.3	Symptomausprägungen an Indikatorpflanzen	45
3.4	Elektronenmikroskopische Identifizierung von CLRV-Partikel	47
3.5	CLRV-Aufreinigung des Holunder-Isolats E603	48
3.6	Etablierung einer IC-RT-PCR zur Testung großer Probenmengen.....	48
3.7	Längenpolymorphismus der 3'UTR von CLRV-Isolaten	51
3.8	Genetische Variabilität der 3'UTR von CLRV-Isolaten	52
3.9	Genetische Stabilität von CLRV-Isolaten bei Vermehrung in Indikatorpflanzen	53
3.10	Phylogenetische Analyse der 3'UTR des CLRV	54
3.11	Identifizierung der Hüllproteinsequenzen von 4 CLRV-Isolaten und phylogenetische Analyse	59
3.12	Rekombinationsanalyse	66
3.13	Vervollständigung der 3'UTR der RNA2 von CLRV-Holunder-Isolat E603	67
3.14	NEI's G_{ST} -Analyse der genetischen Diversität in Abhängigkeit von epidemiologischen Faktoren	70
3.15	Mantel-Test-Analyse der genetischen Diversität in Abhängigkeit von epidemiologischen Faktoren	72
3.16	Vergleich der viralen RNA-Sekundärstruktur der 3'UTR von CLRV.....	76
3.17	Serologischer Vergleich von CLRV-Isolaten mittels mAb-Analyse	81
3.18	Vergleich der serologischen und molekularen Ergebnisse	83
4	Diskussion	85
4.1	Verbreitung und biologische Diversität	85
4.2	Genetische Diversität der 3'-nicht-kodierende Region des CLRV-Genoms	91

4.3	Genetische Diversität der Hüllprotein Region des CLRV-Genoms	97
4.4	Korrelation zwischen der Sequenzdiversität der 3'UTR und epidemiologischen Faktoren	97
4.5	Sekundärstrukturanalyse der 3'-nicht-translatieren Region des CLRV- Genoms	99
4.6	Korrelation von genetischer und serologischer Diversität	101
4.7	Bedeutung der Epidemiologie als Ursache der CLRV-Diversität	103
5	Zusammenfassung	106
6	Summary	107
7	Összefoglalás	108
8	Literaturverzeichnis	110
9	Abkürzungsverzeichnis	122
10	Tabellenverzeichnis	124
11	Abbildungsverzeichnis	125
12	Anlagenverzeichnis	127
13	Anhang	

1 Einleitung

Viren werden als obligate intrazelluläre Parasiten definiert, da sie zur Vermehrung auf den Stoffwechsel ihres Wirtes angewiesen sind (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Sie besitzen große Bedeutung als Krankheitserreger. Als Ursache von neuen sich ausbreitenden Krankheiten stehen Viren noch vor Bakterien, Pilzen und Protozoen sowohl im Human-, im Tier- als auch im Pflanzenreich in der Risikobewertung an erster Stelle (TAYLOR *et al.*, 2001; MORSE, 1993; ANDERSON *et al.*, 2004). Die Veränderungen der Umweltbedingungen, einschließlich der auf landwirtschaftlicher und ökonomischer Aktivität beruhenden Veränderungen, sind dabei die Hauptursachen der in den letzten Jahrzehnten zunehmend zu beobachtenden effizienten Ausbreitung neuer Viruskrankheiten an Pflanzen (MORSE, 1993). Pflanzenviren sind nicht grundsätzlich hoch pathogen, sondern können als ein Teil des pflanzlichen Ökosystems begriffen werden (HURST & LINDQUIST, 2000). In stabilen, lange etablierten Ökosystemen kann es durch evolutionäre Koadaption zur Koexistenz von Wirt und Virus kommen, mit der Folge, dass die Vitalität des Wirtes nicht wesentlich durch eine Virusinfektion beeinflusst wird. Infektionen bleiben unter solchen Bedingungen vielfach symptomlos und unentdeckt. Treffen Viren hingegen auf nicht angepasste neue Wirtspopulationen, zeigen diese oft hohe Mortalitätsraten bevor eine evolutionäre Virus-Wirt-Adaption und -Selektion zu reduzierter Viruslethalität und erhöhter Virulenz führen kann (EWALD, 1994). Aufgrund des kleinen Virusgenoms in Kombination mit hohen Mutationsraten und kurzen Vermehrungszyklen ist die evolutionäre Anpassungsfähigkeit von Viren im Vergleich zu ihren Wirten wesentlich erhöht, wodurch eine Erschließung neuer Wirtspopulationen oder Arten durch Viren stark begünstigt wird (HOLLAND & DOMINGO, 1998).

Infektionen von Kulturpflanzen mit pflanzenpathogenen Viren stellen ein weltweites Risiko für den Anbauer dar und die Auswirkungen sind oft von wirtschaftlicher Bedeutung. Die häufigsten Ursachen für die Verbreitung von Pflanzenviren sind Einschleppung und Veränderungen der biologischen Vektorpopulationen, wodurch der Zugang zu neuen Wirtspflanzen ermöglicht wird. Aber auch genetische Rekombination, veränderte Wetterbedingungen, neue landwirtschaftliche Praktiken oder anfällige, genetisch identische Monokulturen sind häufige Ursachen für neue Virusepidemien (ANDERSON *et al.*, 2004). Ertrags- und Qualitätseinbußen werden durch pathogene Pflanzenviren in nahezu allen wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanzenarten verursacht. Die Kosten die durch Pflanzenpathogene allein in den USA jährlich verursacht wurden, belaufen sich auf schätzungsweise 21,5 Milliarden Dollar (PIMENTEL *et al.*, 2000). Da 47 % aller in den letzten 7 Jahren beschriebenen sich neu ausgebreiteten Pflanzenkrankheiten durch Viren verursacht werden (ANDERSON *et al.*, 2004), ist anzunehmen, dass der durch Pflanzenviren

verursachte Schaden enorm ist. Virusepidemien stellen im Gegensatz zu Epidemien von phytopathogenen Organismen für die Landwirtschaft bzw. den Gartenbau eine besondere Herausforderung dar, da keine heilenden Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen zur Verfügung stehen und eine Ausbreitung von Pflanzenviren sich ausschließlich durch Unterbrechung der Übertragungswege mit vorbeugenden Maßnahmen, wie Vektorbekämpfung und Desinfektion von Pflanzenmaterial, Substrat, Maschinen sowie Werkzeugen und Züchtung resistenter Sorten verhindern lässt (EHRET *et al.*, 2001; JEGER *et al.*, 1998, FUCHS *et al.*, 1997). Untersuchungen zur Populationsgenetik von Viren und die zugrunde liegenden evolutionären Prozesse haben sich in den letzten Jahren zu einem immer stärker wachsenden Wissenschaftszweig der molekularen Epidemiologie entwickelt, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Epidemiologie und Kontrolle von Viruserkrankungen liefern (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2001).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen und serologischen Diversität des Kirschenblattrollvirus (CLRV, abgeleitet vom englischen *Cherry leaf roll virus*), einem Pflanzenvirus, dessen weltweite Verbreitung gut dokumentiert ist, über das aber bisher nur begrenzte Informationen zur Diversität der Viruspopulationen und deren Einfluss auf Wirtspflanzenkreis, geographische Verbreitung und Epidemiologie vorliegen. Untersuchungen zur serologischen und molekularen Diversität von Pflanzenviren schaffen Voraussetzungen zum besseren Verständnis der Biologie und Epidemiologie von Viren. So zeigen beispielsweise die Studien zum *Cucurbit yellow stunting disorder closterovirus* (CYSDV), *Beet pseudo-yellows closterovirus* (BPYV) und *Lettuce infectious yellows closterovirus* (LIYV) von RUBIO *et al.* (1999), dass die Verbreitung dieser Viren stark vom biologischen Vektorspektrum an den verschiedenen Standorten abhängig ist, Viruspopulationen bei großer räumlicher Distanz genetisch isoliert werden und sich voneinander differenzieren können. Solche Informationen können dazu beitragen die Mechanismen zu verstehen, die u. a. zu Veränderungen in der Virulenz, zum Auftreten Resistenz brechender viraler Phänotypen, zur Wirtsadaption und zur geographischen Verbreitung von Pflanzenviren führen.

1.1 Natürliche Verbreitung des CLRV

Das *Cherry leaf roll virus* besitzt innerhalb der Pflanzenviren die seltene Fähigkeit eine Vielzahl von Gehölzen unterschiedlichster Gattungen zu infizieren. An Bäumen und Sträuchern wurde das natürliche Auftreten von CLRV bisher in folgenden Gattungen nachgewiesen: Birke (*Betula* sp., SCHMELZER, 1972a; COOPER & ATKINSON, 1975), Hainbuche (*Carpinus* sp., REBENSTORF, 2002), Hartriegel (*Cornus* sp., WATERWORTH & LAWSON, 1973), Pfaffenhütchen (*Euonymus* sp., LARSEN *et al.*, 1990), Buche (*Fagus* sp., WINTER & NIENHAUS, 1989), Esche (*Fraxinus* sp., NIENHAUS & HAMACHER, 1990, FORD *et al.*,

1972), Walnuss (*Juglans* sp., COOPER & EDWARDS, 1980; MIRCETICH *et al.*, 1980; DE ZOETEN *et al.*, 1982; ROWHANI *et al.*, 1985), Liguster (*Ligustrum* sp., SCHMELZER, 1972b), Olive (*Olea* sp., SAVINO & GALLITELLI, 1981), Kirsche (*Prunus* sp., CROPLEY, 1960; CROPLEY, 1961, SCHIMANSKI *et al.*, 1975a; SCHIMANSKI *et al.*, 1975b), Lederstrauch (*Ptelea* sp., SCHMELZER, 1972b), Faulbaum (*Rhamnus* sp., WERNER *et al.*, 1997), Brombeere und Himbeere (*Rubus* sp., CROPLEY, 1961; HANSEN, 1967; CROPLEY & TOMLINSON, 1971; HANSEN & STACE-SMITH, 1971; JONES & MURANT, 1971; JONES & WOOD, 1978), Holunder (*Sambucus* sp., SCHMELZER, 1966; SCHMELZER, 1972b; JONES & MURANT, 1971), Flieder (*Syringa* sp., NÓVÁK & LANZOVÁ, 1975), Ulme (*Ulmus* sp., VARNEY & MOORE, 1952; JONES & MURANT, 1971, SCHMELZER, 1972b) und Wein (*Vitis* sp., HERRERA & MADARIAGA, 2001). Zu bedeutenden natürlichen krautigen Wirtspflanzen zählen Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.; TOMLINSON & WALKEY, 1967) und Schnitt-Knoblauch (*Allium tuberosum* Rottler; YAMASHITA & FUKUI, 2004). Andere krautige Wirtspflanzen sind Rittersporn (*Delphinium* x; AHMED & BAILISS, 1975), stumpfblättriger Ampfer (*Rumex obtusifolius* L.) und Graukresse (*Berteroa incana* (L.) CD., JONES, 1985). Der experimentelle Wirtspflanzenkreis des CLRV ist sehr groß und umfasst Pflanzenarten aus mehr als 36 Familien (JONES, 1985).

Berichte über das Auftreten des CLRV stammen aus Europa, Nordamerika, der Türkei, Neuseeland, den Ländern der ehemaligen Sowjetunion (JONES, 1985), Japan (YAMASHITA & FUKUI, 2004) und Chile (HERRERA & MADARIAGA, 2001). In diesen Gebieten konnte das CLRV im Forst, im Öffentlichen Grün oder in Baumschulen immer wieder vereinzelt nachgewiesen werden. Ein großer Anteil der Erstbeschreibungen über natürliche CLRV-Infektionen an Gehölzen stammt aus Deutschland.

CLRV verursacht Symptome an Blättern, Blüten, Früchten und im kambialen Stammbereich. Der Grad der Schädigung variiert in Abhängigkeit von der Wirtspflanzengattung und -art, dem Alter der Wirtspflanze, der Jahreszeit und dem allgemeinen Gesundheitszustand der Pflanze. In Anbaugebieten Süd- und Osteuropas und den USA wurde vereinzelt von wirtschaftlich bedeutsamen Schäden bei Pfropfübertragungen von CLRV-infizierten Walnuss-Unterlagen auf Walnuss-Hybridsorten berichtet (BROOKS & BRUENING, 1995b). In allen Ländern der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Australien, Kanada und den USA besitzt CLRV bei der Einfuhr von Pflanzenmaterial den Quarantänestatus (Anonymus, 2003; MAINOLFI, 2001).

1.2 Molekulare, serologische und biologische Eigenschaften des CLRV

CLRV gehört zur Familie *Comoviridae* und wird der Gattung *Nepovirus* zugeordnet. Das Virus besitzt ein zweigeteiltes Genom bestehend aus RNA1 (ca. 8200 Basen Gesamtlänge) und RNA2 (ca. 6700 Basen Gesamtlänge) (MURANT *et al.*, 1981). Beide genomischen

einzelsträngigen RNA-Moleküle mit Positivstrang-Orientierung sind getrennt in isometrische Partikel verpackt. Sie besitzen jeweils einen PolyA-Schwanz, weisen ein genomgekoppeltes kovalent gebundenes virales Protein (VPg) auf und kodieren für Polyproteine. Außergewöhnlich ist die lange 3'-terminale nicht-kodierende Region (3'UTR, „untranslated region“), die auf beiden genomischen RNAs hochkonserviert und charakteristisch für Nepoviren der Untergruppe 3 ist (HULL, 2002; VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

Die Genomorganisation von CLRV scheint, basierend auf den wenigen verfügbaren Sequenzinformationen, prinzipiell der Genomorganisation anderer gut charakterisierter Nepoviren der Untergruppe 3 zu entsprechen. Beide RNAs von Nepoviren der Subgruppe 3 besitzen einen offenen Leserahmen (ORF, open reading frame), begrenzt durch eine UTR am 3'- und 5'-Ende. Die beiden ORFs kodieren jeweils für ein Polyprotein, die durch virus-kodierte Proteasen in kleinere funktionelle Proteine proteolytisch gespalten werden, um die jeweiligen Proteine freizugeben. Das Polyprotein der RNA1 kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP), eine Protease (Pro), ein vermutlich NTP-bindendes Protein (NTB), das VPg und eine Helikase. Das Polyprotein der RNA2 kodiert für ein Hüllprotein (coat protein, CP), das Transportprotein (movement protein, MP) und ein Protein (2A-Protein), welches an der Replikation des Virus beteiligt ist (WANG & SANFAÇON, 2000). Es liegen bisher ausschließlich von Teilen des 3'-terminalen nicht-kodierenden CLRV-Genoms veröffentlichte Sequenzinformationen für mehr als ein CLRV-Isolat aus verschiedenen Wirtspflanzen vor. Für einen Teilbereich des Polyproteins der RNA1, kodierend für die RdRP, liegt ein 719 bp langes Fragment für ein Eschen-Isolat des CLRV vor (MALIOGA *et al.*, 2004) und für einen Teilbereich des Polyproteins der RNA2, kodierend für das Hüllprotein, liegt eine vollständige Sequenzinformationen für ein Birken-Isolat (SCOTT *et al.*, 1992) des CLRV in der European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Nucleotide Sequence Database vor. RNA1 und RNA2 sind beide für eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanzen notwendig (HARRISON *et al.*, 1972; RANGLES *et al.*, 1977). Vom nah verwandten *Tobacco black ring nepovirus* (TBRV) ist bekannt, dass die RNA1 die Determinanten für den Wirtspflanzenkreis, die Saatgutübertragung und die Art der Symptomausprägung, während die RNA2 die Determinanten für die Übertragung durch Nematoden und die serologische Spezifität trägt (HANADA & HARRISON, 1977; HARRISON *et al.*, 1974; HARRISON & MURANT, 1977). In der Literatur ist die Übertragung durch biologische Vektoren von CLRV umstritten, möglicherweise sind die Determinanten für die anderen biologischen Funktionen jedoch ähnlich organisiert wie beim TBRV und anderen Nepoviren. Es gibt mehrere Stämme oder Virusvarianten des CLRV, die sich serologisch unterscheiden lassen. Große serologische Unterschiede können zwischen CLRV-Isolaten aus verschiedenen Gehölzgattungen auftreten. Dagegen sind die Unterschiede zwischen Isolaten aus der gleichen Wirtspflanzengattung und verschiedener geographischer Herkunft schwächer ausgeprägt

(DE ZOETEN *et al.*, 1982; JONES & MURANT, 1971; SCHMELZER, 1966; SCHMELZER, 1972b; TÓBIÁS, 1995). Es lassen sich mindestens drei verschiedene Serogruppen unterscheiden: CLRV-Walnuss- und CLRV-Holunder-Isolate als zwei verschiedene Gruppen, Birken- und Kirschen-Isolate als eine dritte gemeinsame Serogruppe (COOPER, 1976). In Übereinstimmung mit dieser serologischen Gruppierung unterscheiden sich CLRV-Isolate auch biologisch. So ließen sich beispielsweise ein CLRV-Isolat aus Süßkirschen und ein CLRV-Isolat aus Kanadischem Holunder mechanisch nicht auf Walnusspflanzen übertragen. Isolate aus Walnuss konnten hingegen Walnusspflanzen dergleichen Sorte infizieren (ROWHANI & MIRCETICH, 1988). Auch konnte bei Kreuzübertragungsversuchen, d. h. bei Übertragungen von vier CLRV-Isolaten aus Süßkirsche (*Prunus avium* L.), Amerikanischer Ulme (*Ulmus americana* L.), Kanadischem Holunder (*Sambucus canadensis* L.) und Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.) auf unterschiedliche natürliche Wirtspflanzen des CLRV, festgestellt werden, dass sich der Übertragungserfolg zwischen den Isolaten und zwischen den natürlichen Wirtspflanzen unterscheidet (JONES, 1973).

1.3 Übertragung des CLRV durch Pollen und Samen

Die natürliche Übertragung des CLRV erfolgt durch Samen und Pollen. Bei Pollen, produziert von infizierten Gehölzen, konnte CLRV sowohl an der Oberfläche von anemophilen (windblütigen) Pollen, wie z. B. von Birke und Walnuss, als auch an der Oberfläche von entomophilen (insektenblütigen) Pollen, wie z. B. von Kirsche, nachgewiesen werden (COOPER *et al.*, 1984; MASSALSKI & COOPER, 1984). Bei Birken- und Walnusspollen ließ sich CLRV auch im Zellinneren nachgewiesen. CLRV wird durch den infizierten Pollen über die Befruchtung der Eizelle auf gesunde Pflanzen übertragen. Die Effizienz der Übertragung auf die Keimlinge unterscheidet sich stark in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenart (0.5-45 %, (JONES, 1985; QUACQUARELLI & SAVINO, 1977)). Diese vertikale Übertragung des CLRV über die Samen auf die Nachkommenschaft ist bei künstlich erfolgter Bestäubung mittels CLRV-infizierter Pollen für verschiedene Wirtspflanzen, z. B. für die Amerikanische Ulme (*Ulmus americana* L.), Sand-Birke (*Betula pendula* Roth.), Süßkirsche (*Prunus avium* L.), Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.), Schwarzen Holunder (*Sambucus nigra* L.) und für Walnuss (*Juglans regia* L.) nachgewiesen worden. Die epidemiologische Bedeutung der vertikalen, natürlichen Übertragung von CLRV mittels Samen auf die Nachkommenschaft konnte außerdem durch Felduntersuchungen belegt werden (COOPER *et al.*, 1984). Untersuchungen zu Keimungsraten CLRV-infizierter Birkensamen unter kontrollierten Bedingungen zeigten, dass eine Infektion des weiblichen oder des männlichen oder beider Partner eine geringere Keimung der Samen zur Folge hatte. Die geringsten Keimungsraten lagen dann vor, wenn nur der weibliche Partner infiziert war. Die Birken- und Ulmen-Stämme des CLRV können außer durch infizierten Pollen auch, ausgehend von systemisch infizierten Mutterpflanzen, über die sich entwickelnde Eizelle auf den Samen übertragen werden (COOPER *et al.*, 1984;

MINK, 1993). Dabei ist die Effizienz der Übertragung von infizierten Pflanzen auf den befruchteten Samen von der Virus-Wirt-Kombination abhängig (MINK, 1993; SCHIMANSKI, 1987). Eine Samenübertragung des CLRV konnte bei einer Reihe krautiger Wirtspflanzen im Experiment festgestellt werden (z. B. *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. album*, *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum*, *N. megalosiphon*, Rhabarber (*Rheum rhabarbarum*), Sojabohne (*Glycine max*), Stiefmütterchen (*Viola tricolor*), Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*). CLRV wird bei vielen krautigen Pflanzen mit größerer Effizienz als bei holzigen Pflanzen durch den Samen übertragen. Die höchste Samenübertragungsrate wurde bei *G. max* mit 100 % (LISTER & MURANT, 1967), die niedrigste bei *Nicotiana tabacum* mit 0,6 % (SCHMELZER, 1966) festgestellt. Wodurch diese Unterschiede in der Effizienz der Samenübertragung bedingt sind, ist nicht bekannt. Möglicherweise bestehen bei verschiedenen Wirtspflanzen Unterschiede in der Effizienz der Ausbreitung des CLRV im meristematischen Gewebe.

Wie die horizontale Übertragung von CLRV zwischen infizierten Pflanzen erfolgt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Bei der Ausbreitung von CLRV in Walnussplantagen in Kalifornien wurde festgestellt, dass erst nach der Blüte der Walnussbäume und erfolgter Pollenproduktion eine Ausbreitung von infizierten auf benachbart stehende, gesunde Walnussbäume stattfand (MIRCETICH *et al.*, 1980). Der Mechanismus der Ausbreitung des CLRV über infizierten Pollen blieb dabei ungeklärt. Es konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden, ob und unter welchen Bedingungen eine systemische Ausbreitung des Virus nach Polleninfektion der Keimanlagen auf die gesunden Mutterpflanzen bei verschiedenen Wirtspflanzenarten erfolgen kann. Aufgrund morphologischer Barrieren, unter anderem der Bildung einer Kalloeschicht zwischen dem Embryo und der Mutterpflanze, ist es unwahrscheinlich, dass eine systemische Infektion der Mutterpflanze, ausgehend von infizierten Keimanlagen, sehr effizient erfolgt und epidemiologisch eine große Bedeutung besitzt (MINK, 1993). Wahrscheinlich ist eine systemische Ausbreitung von CLRV in der Pflanze nach Infektion der Keimanlagen stark abhängig von der Wirtspflanzenart und deren Entwicklungszustand zum Zeitpunkt der Infektion (JOHANSEN *et al.*, 1994). Die Infektion gesunder Walnussbäume in kalifornischen Plantagen könnte außer über die Polleninfektion der Keimanlagen und anschließender systemischer Invasion der Mutterpflanzen auch über eine Infektion der nicht-meristematischen Gewebe der Mutterpflanzen mittels infizierten Pollens erfolgt sein, z. B. durch Übertragung von Pollen über Wunden in Blattgewebe und möglicherweise auch unter Mitwirkung von Insekten. Unabhängig vom genauen Mechanismus der Pollenübertragung wird der horizontalen Übertragung des CLRV mittels Pollen aus epidemiologischer Sicht heute eine große Bedeutung beigemessen, weil sich das Pathogen so in Produktionsanlagen und Waldbeständen schnell etablieren kann (MANDAHAR & GILL, 1984). Da bei Süßkirsche eine Infektion mit CLRV bevorzugt an den Rändern von

Plantagen, die an Parkanlagen mit Zier- und Wildgehölzen grenzen, beobachtet worden ist (KEGLER *et al.*, 1966), könnte auch eine Infektion von Süßkirschen-Kulturbeständen, beispielsweise ausgehend von allgemein stark mit CLRV-infizierten Birkenbeständen epidemiologisch bedeutsam sein. Beim Vorliegen einer ausschließlich durch die Samenübertragung erfolgten vertikalen Ausbreitung von CLRV würden nach Berechnungen von COOPER *et al.* (1984) in natürlicherweise CLRV-infizierten und sich reproduzierenden Birkenbeständen bereits nach zwei Generationen keine CLRV-infizierten Individuen mehr aufzufinden sein. Beobachtungen im Freiland haben gezeigt, dass das Auftreten von CLRV eher sporadisch ist. Es liegen keine Berichte darüber vor, dass jemals ganze Bestände großflächig mit CLRV infiziert worden wären. Auch in nicht-CLRV-infizierten Pflanzen, die in direkter Nachbarschaft von CLRV-infizierten Pflanzen stehen, konnte nach Jahren keine CLRV-Infektion nachgewiesen werden (SCHMELZER, 1972a; REBENSTORF, 2002). Es ist daher davon auszugehen, dass bei verschiedenen Pflanzenarten die horizontale Übertragung von CLRV unterschiedlich effizient ist.

1.4 Übertragung des CLRV durch biologische Vektoren

Viele Viren der Gattung Nepovirus werden durch Nematoden übertragen. CLRV wurde schon 1966 von FRITSCH & KEGLER daraufhin überprüft und *Xiphinema coxi* 'Tarja' und *X. diversicaudatum* als Vektoren für das Kirschen-Isolat des CLRV beschrieben. In den 80er Jahren konnten diese Untersuchungen in unterschiedlichen Experimenten verschiedener Autoren jedoch nicht bestätigt werden (JONES & WOOD, 1978; COOPER, 1988; JONES *et al.*, 1981). Somit ist die Nematodenübertragbarkeit für CLRV anzuzweifeln oder gilt möglicherweise nicht für alle Isolate.

Ob eine Übertragung von CLRV durch Insekten erfolgen kann, ist bisher nur vereinzelt untersucht worden. Für den Ulmen-Stamm des CLRV, das *Elm mosaic virus* (EMV), wurde die Möglichkeit einer Übertragung durch die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) im Experiment ausgeschlossen (FORD *et al.*, 1972). WERNER und Mitarbeiter konnten 1997 CLRV an der Birkenwanze (*Kleidocerys resedae*) mittels RT-PCR nachweisen, die auf CLRV-infizierten Sand-Birken eingesammelt worden waren. *K. resedae* ist weltweit verbreitet und tritt vor allem an Birken im Herbst in hohen Populationsdichten auf. Weitere bevorzugte natürliche Wirte der Wanze sind neben Birke auch eine Reihe anderer Laubbaumarten (WHEELER, 1976). Einige dieser Gehölzarten sind ebenfalls natürliche Wirtspflanzen des CLRV. Daher stellt *K. resedae* einen potenziellen Vektor für das pollenbürtige CLRV dar. *K. resedae* gehört zur Ordnung Hemiptera (*Rhynchotha*, Schnabelkerfe), zur Unterordnung Heteroptera (Wanzen) und zur Familie Lygaeidae (Ritterwanzen, Langwanzen). Die Adulten entwickeln sich hauptsächlich auf den Blüten ihrer Wirtspflanzen, legen dort auch ihre Eier ab und ernähren sich von Birkenpollen und Pflanzensaft (WHEELER, 1976). Nähere

Informationen über eine mögliche Beteiligung der Wanzen an der Übertragung von CLRV auf gesunde Pflanzen und die epidemiologische Relevanz eines solchen Übertragungsmechanismus sind nicht bekannt. Auch über eine Beteiligung anderer Insekten, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Verschleppung CLRV-infizierten Pollens stehen könnten, liegen keine epidemiologischen Studien vor.

1.5 Zielstellung

Die vereinzelt Informationen zur genetischen und serologischen Diversität von CLRV waren Anlass für diese Untersuchungen. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine möglichst große Anzahl an CLRV-Isolaten zu sammeln und diese vergleichend, sowohl biologisch als auch serologisch und molekularbiologisch zu untersuchen. Dabei sollten auch bereits beschriebene CLRV-Isolate in die Vergleiche mit eingeschlossen werden. Die genetische und serologische Analyse einer Vielzahl von CLRV-Isolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft und isoliert aus verschiedenen Wirtspflanzenarten sollte zur Aufklärung der Variabilität von CLRV-Stämmen beitragen und zur Identifizierung konservierter Genombereiche führen. Hieraus sollten Rückschlüsse über die Stabilität von Viruspopulationen innerhalb ihrer Verbreitungsgebiete bzw. Wirtspflanzenkreise abgeleitet werden. Die fünf Schwerpunkte dieser Arbeit werden nachfolgend benannt:

Identifizierung von CLRV-Isolaten mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften durch Infektion von Testpflanzen im Gewächshaus

Es sollten in verschiedenen Regionen Deutschlands Probenahmen an unterschiedlichen Wirtspflanzen und Nicht-Wirtspflanzen des CLRV durchgeführt werden und CLRV-infizierte Pflanzen durch verschiedene Nachweisverfahren bestimmt werden. Durch mechanische Inokulation krautiger Testpflanzen sollten Isolate mit verschiedenen biologischen Eigenschaften und unterschiedlichem experimentellen Wirtspflanzenkreis identifiziert werden.

Identifizierung und Vergleich von hochkonservierten und variablen Bereichen des CLRV-Genoms verschiedener CLRV-Isolate

Verschiedene PCR-Verfahren sollten zur Amplifizierung kodierender und nicht-kodierender Genombereiche des CLRV-Genoms eingesetzt und entwickelt werden. Nach PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung sollten, basierend auf kodierenden und nicht-kodierenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, phylogenetische Analysen zur Ermittlung der Verwandtschaftsverhältnisse und der genetischen Variabilität und Diversität verschiedener Genombereiche von Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen durchgeführt werden, um Sequenzabschnitte und Aminosäuremotive, die bei CLRV-Isolaten aus verschiedenen Wirten hochkonserviert sind, zu identifizieren. Dies soll die Grundlage für

ein empfindliches stamm- bzw. varianten-spezifisches RT-PCR-Nachweis- bzw. Differenzierungsverfahren zum Einsatz für epidemiologische Studien im Freiland schaffen.

RNA-Sekundärstrukturanalyse kodierender und nicht-kodierender Genombereiche des CLRV

Der 3'-terminale nicht-kodierende Genombereich (3'UTR) kann bei Pflanzenviren ein Zusammenspiel zwischen Struktur und Funktion aufweisen. Durch RNA-Sekundärstrukturanalysen sollte untersucht werden, ob Vorhersagen zur Faltung von möglichen konservierten Bereichen der Virus-RNA anhand einer Konsensussequenz möglich sind, um Hinweise auf die Funktion der 3'UTR des CLRV zu erhalten.

Sequenzierung längerer zusammenhängender Genombereiche des CLRV

Auf Grund der wenigen zur Verfügung stehenden Sequenzinformationen sollte ein längerer zusammenhängender Genombereich eines CLRV-Isolats sequenziert werden. Darauf aufbauend sollen in weiterführenden Untersuchungen die Gesamtsequenzen der RNA1 und RNA2 des CLRV Genoms entschlüsselt werden.

Ermittlung der möglichen epidemiologischen Relevanz von Insekten bei der Übertragung des CLRV

Im Freiland gesammelte Insekten-Proben aus CLRV-infizierten Beständen sollten mittels IC-RT-PCR auf eine CLRV-Kontamination getestet werden, um mögliche Virusvektoren zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Untersuchungsstandorte

In den Jahren 2001 bis 2004 wurden deutschlandweit (Abb. 1 im Ergebnisteil) Blattproben mit CLRV (*Cherry leaf roll virus*) -verdächtigen Symptomen von bekannten Wirtspflanzen des CLRV gesammelt. Zusätzlich wurden Blattproben von Pflanzen in diese Untersuchungen einbezogen, die bislang nicht als Wirtspflanze des CLRV bekannt sind, sich jedoch in räumlicher Nachbarschaft zu den untersuchten CLRV-Wirtspflanzen befanden und virusverdächtige Blattsymptome aufwiesen. Die untersuchten Proben stammen aus Forstbeständen, Öffentlichen Grünanlagen, Baumschulen und Privatgärten. Die aufgetretenen virusverdächtigen Symptome konnten in der Regel nur zum Zeitpunkt der Probenahme dokumentiert werden. Lediglich im Berliner Raum wurden die symptomtragenden Gehölze während der gesamten Vegetationsperiode in Hinsicht auf Symptomausprägung und -entwicklung überprüft. Ferner wurde virusverdächtiges Blattmaterial in Ungarn, England, den Niederlanden und Neuseeland gesammelt. Das gesammelte frische Blattmaterial wurde mittels Immunocapture-Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (IC-RT-PCR, 2.10) auf eine Infektion mit dem CLRV getestet und anschließend in verschweißten Plastiktüten bei -20 °C gelagert. Alle gesammelten und untersuchten Proben wurden mit einer Eingangsnummer (E-Nummer) gekennzeichnet. Der Zeitpunkt der Probenahme und die Herkunft sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Pflanzenarten, Kurzbezeichnung (Eingangsnummer), Herkunft und Zeitpunkt der Probenahme

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft
1	E119	<i>Sambucus nigra</i> L.	09.05.2001	Berlin-Zehlendorf-1 (Lentzeallee Zaun)
2	E120	<i>Betula pendula</i> Roth.	25.05.2001	Berlin-Spandau
3	E121	<i>Betula pendula</i> Roth.	25.05.2001	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)
4	E135	<i>Betula pendula</i> Roth.	06.06.2001	Fellinghausen
5	E137	<i>Betula pendula</i> Roth.	06.06.2001	Fellinghausen
6	E138	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	07.06.2001	Fellinghausen
7	E139	<i>Fagus sylvatica</i> L.	07.06.2001	Fellinghausen
8	E140	<i>Sambucus nigra</i> L.	06.06.2001	Fellinghausen
9	E141	<i>Carpinus betulus</i> L.	06.06.2001	Fellinghausen
10	E142	<i>Betula pendula</i> Roth.	06.06.2001	Fellinghausen
11	E143	<i>Betula pendula</i> Roth.	06.06.2001	Fellinghausen
12	E157	<i>Sambucus nigra</i> L.	06.06.2001	Budapest (H)
13	E158	<i>Betula pendula</i> Roth.	11.06.2001	Berlin-Tempelhof

Fortsetzung Tab. 1:

Nr.	Eingangs- nummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft
14	E160	<i>Betula pendula</i> Roth.	11.06.2001	Berlin-Neukölln
15	E161	<i>Betula pendula</i> Roth.	11.06.2002	Berlin-Neukölln
16	E431	<i>Ulmus laevis</i> Pall.	15.05.2002	Meisdorf
17	E433	<i>Carpinus betulus</i> L.	15.05.2002	Meisdorf
18	E435	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	15.05.2002	Meisdorf
19	E436	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	15.05.2002	Meisdorf
20	E437	<i>Betula pendula</i> Roth.	16.05.2002	Aschersleben
21	E438	<i>Sambucus nigra</i> L.	16.05.2002	Aschersleben
22	E439	<i>Hedera helix</i> L.	16.05.2002	Aschersleben
23	E440	<i>Sambucus nigra</i> L.	15.05.2002	Meisdorf
24	E441	<i>Sambucus nigra</i> L.	15.05.2002	Aschersleben
25	E442	<i>Betula pendula</i> L.	17.05.2002	Gatersleben
26	E443	<i>Sambucus nigra</i> L.	20.05.2002	Berlin-Neukölln
27	E444	<i>Carpinus betulus</i> L.	20.05.2002	Berlin-Neukölln
28	E445	<i>Betula pendula</i> Roth.	20.05.2002	Berlin-Neukölln
29	E446	<i>Fagus sylvatica</i> L.	20.05.2002	Berlin-Neukölln
30	E448	<i>Syringa vulgaris</i> L.	20.05.2002	Berlin-Neukölln
31	E484	<i>Carpinus betulus</i> L.	29.05.2002	Fischland/Darß
32	E485	<i>Sambucus nigra</i> L.	29.05.2002	Fischland/Darß
33	E491	<i>Sambucus nigra</i> L.	05.06.2002	Siófok (H)
34	E492	<i>Sambucus nigra</i> L.	06.06.2002	Sümeg (H)
35	E493	<i>Syringa vulgaris</i> L.	08.06.2002	Berlin-Neukölln
36	E498	<i>Ulmus minor</i> Mill.	09.06.2002	Berlin-Zehlendorf-3 (Berkaer Str.)
37	E499	<i>Betula pendula</i> Roth.	08.06.2002	Berlin-Zehlendorf-3 (Berkaer Str.)
38	E510	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	14.06.2002	Bad Salzufflen
39	E541	<i>Sambucus nigra</i> L.	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)
40	E542	<i>Ulmus minor</i> Mill.	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)
41	E543	<i>Laburnum anagyroides</i> Medik.	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)
42	E544	<i>Carpinus betulus</i> L.	28.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)
43	E566	<i>Betula pendula</i> Roth.	28.06.2002	Fellinghausen
44	E567	<i>Fagus sylvatica</i> L.	28.06.2002	Niedereimer
45	E568	<i>Sambucus nigra</i> L.	28.06.2002	Balve
46	E569	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	28.06.2002	Balve
47	E570	<i>Malus</i> sp.	28.06.2002	Balve
48	E571	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	28.06.2002	Balve
49	E572	<i>Rubus idaeus</i> L.	28.06.2002	Fellinghausen
50	E573	<i>Rhamnus frangula</i> L.	28.06.2002	Fellinghausen
51	E574	<i>Betula pendula</i> Roth.	28.06.2002	Fellinghausen
52	E575	<i>Aegopodium podagraria</i> L.	28.06.2002	Niedereimer
53	E576	<i>Sambucus nigra</i> L.	28.06.2002	Fellinghausen (gleicher Baum wie E140)
54	E577	<i>Betula pendula</i> Roth.	28.06.2002	Fellinghausen

Fortsetzung Tab. 1:

Nr.	Eingangs- nummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft
55	E578	<i>Carpinus betulus</i> L.	28.06.2002	Niedereimer
56	E579	<i>Betula pendula</i> Roth.	28.06.2002	Fellinghausen
57	E580	<i>Betula pendula</i> Roth.	28.06.2002	Fellinghausen
58	E581	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	29.06.2002	Neuruppin/ Linum
59	E582	<i>Rhamnus frangula</i> L.	29.06.2002	Neuruppin/ Linum
60	E583	<i>Sambucus nigra</i> L.	29.06.2002	Neuruppin/ Linum
61	E598	<i>Ulmus laevis</i> Pall.	11.07.2002	Berlin-Malchow
62	E601	<i>Sambucus nigra</i> L.	07.07.2002	Berlin-Zehlendorf-4 (Grunewaldsee)
63	E602	<i>Aegopodium podagraria</i> L.	07.07.2002	Berlin-Zehlendorf-4 (Grunewaldsee)
64	E603	<i>Sambucus nigra</i> L.	08.07.2002	Werder
65	E610	<i>Betula pendula</i> Roth.	16.07.2002	Dresdner Heide
66	E622	<i>Sambucus nigra</i> L.	19.07.2002	Berlin-Zehlendorf-5 (Lentzeallee 75)
67	E640	<i>Rhamnus frangula</i> L.	31.07.2002	Klövensteen
68	E641	<i>Betula pendula</i> Roth.	31.07.2002	Klövensteen
69	E645	<i>Betula pendula</i> Roth.	03.08.2002	Vaals (NL)
70	E646	<i>Betula pendula</i> Roth.	02.08.2002	Aachen
71	E667	<i>Betula pendula</i> Roth.	09.09.2002	Berlin-Treptow
72	E676	<i>Sambucus nigra</i> L.	24.09.2002	Helgoland
73	E678	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	07.10.2002	Andechs
74	E679	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	07.10.2002	Freiburg
75	E775	<i>Betula pendula</i> Roth.	29.01.2003	Lake Karapiro (NZ)
76	E776	<i>Betula pendula</i> Roth.	29.01.2003	Napier Bluff Hill (NZ)
77	E836	<i>Betula nigra</i> L.	01.06.2003	Hannover-Herrenhausen
78	E837	<i>Betula occidentalis</i> Hook.	01.06.2003	Hannover-Herrenhausen
79	E838	<i>Betula platyphylla</i> 'Japonica'	01.06.2003	Hannover-Herrenhausen
80	E839	<i>Sambucus nigra</i> L.	17.06.2003	Berlin-Zehlendorf-4 (Lentzeallee 75, gleicher Baum wie E622)
81	E896	<i>Betula pendula</i> Roth.	30.06.2003	Berlin-Zehlendorf-6 (Thielallee)
82	E912	<i>Ulmus laevis</i> Pall.	30.06.2003	Potsdam
83	E950	<i>Sambucus nigra</i> L.	20.07.2003	Aschersleben
84	E951	<i>Betula pendula</i> Roth.	14.07.2003	Leamington Spa (UK)
85	E952	<i>Ulmus</i> sp.	14.07.2003	Leamington Spa (UK)
86	E957	<i>Forsythia intermedia</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
87	E958	<i>Corylus avellana</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
88	E959	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
89	E960	<i>Carpinus betulus</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
90	E961	<i>Aegopodium podagraria</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
91	E962	<i>Sambucus nigra</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
92	E963	<i>Fagus sylvatica</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
93	E964	<i>Prunus avium</i> L.	29.07.2003	Dachau/Süd
94	E1680	<i>Sambucus nigra</i> L.	22.04.2004	Berlin-Zehlendorf-4 (Lentzeallee 75, gleicher Baum wie E622)

Fortsetzung Tab. 1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft
95	E1681	<i>Alliaria petiolata</i> L.	24.04.2004	Berlin-Zehlendorf-1 (Lentzeallee Zaun)
96	E1682	<i>Sambucus nigra</i> L.	24.04.2004	Berlin-Zehlendorf-1 (Lentzeallee Zaun, gleicher Baum wie E119)
97	E1708	<i>Sambucus nigra</i> L.	17.05.2004	Kleinbeeren - Strauch 1
98	E1709	<i>Sambucus nigra</i> L.	17.05.2004	Kleinbeeren - Strauch 2
99	E1718	<i>Sambucus nigra</i> L.	01.06.2004	Norton Lindsey, UK
100	E1733	<i>Wisteria sinensis</i> L.	11.06.2004	Berlin-Neukölln
101	E1745	<i>Betula pendula</i> Roth.	10.06.2004	Berlin-Zehlendorf-6 (Thielallee, gleicher Baum wie E896)
102	E1746	<i>Sambucus nigra</i> L.	22.06.2004	Insel Poel
103	E1747	<i>Sambucus nigra</i> L.	22.06.2004	Wismar
104	E1765	<i>Cornus</i> sp.	14.07.2004	Kreutztal
105	E1766	<i>Betula pendula</i> Roth.	15.07.2004	Berlin-Zehlendorf-7 (ATW 5/1)
106	E1771	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	08.08.2004	Hamburg-Winterhude

2.2 Virusisolate

Einige in diese Untersuchungen mit einbezogenen CLRV-Isolate wurden freundlicherweise von Rozália Zsovák-Hangyál vom Fejér Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat (Pflanzen- und Bodenschutzdienst des Komitats Fejér) in Velence (Ungarn), von Herrn Dr. J. Hamacher aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn, von Dr. T. Candresse vom l'Institut de biologie végétale moléculaire (*INRA*) in Bordeaux (Frankreich), von Dr. T. A. Jones vom Scottish Research Crop Institute in Dundee (Schottland, UK) und von Dr. I. Cooper vom Centre for Ecology and Hydrology (CEH) in Oxford (England, UK) zur Verfügung gestellt. Weitere Originalproben und CLRV-Isolate stammen vom Fachgebiet Phytomedizin des Institutes für Gartenbauwissenschaften der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin und von U. Ipach vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz. In dieser Arbeit wird der Begriff Probe (Originalprobe, O) für Pflanzematerial verwendet, das natürlich mit CLRV infiziert war. Der Begriff Isolat (I) bezeichnet CLRV-infiziertes Pflanzenmaterial nach Vermehrung in krautigen Testpflanzen. Hierbei hat also bereits eine Übertragung von CLRV von der natürlichen Wirtspflanze auf eine Testpflanze stattgefunden. Alle zur Verfügung gestellten Proben und Isolate wurden mit einer Eingangsnummer (E-Nummer) versehen. Die Herkunft der Proben und die Art der Lagerung sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Originale Feldproben (O) und CLRV-Isolate (I), die von verschiedenen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt worden sind.

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Herkunft	Lagerung / Referenz
107	E105 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Klövensteen	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001
108	E106 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Aurich	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001
109	E107 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Flensburg	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001
110	E108 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Bonn	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001
111	E109 ⁷	<i>Fagus sylvatica</i> L.	O Kreuztal	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001
112	E110 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	I Unbekannt	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 08/91, auf C.q. am 7/99
113	E111 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	I Klövensteen	tiefgefroren, gesammelt am 05/96; C.q., -20 °C
114	E112 ⁷	<i>Sambucus nigra</i> L.	O Denzlingen	tiefgefroren; Blattmaterial, -20 °C
115	E113 ⁷	<i>Fagus sylvatica</i> L.	O Siebengebirge	tiefgefroren, gesammelt am 10/91; Blattmaterial, -20 °C
116	E114 ⁷	<i>Sambucus nigra</i> L.	O Neue Heide	tiefgefroren, gesammelt am 16.06.2001; Blattmaterial, -20 °C
117	E115 ⁷	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	O Unbekannt	tiefgefroren, gesammelt am 06/98;
118	E154 ¹	<i>Juglans regia</i> L.	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 479. díó, 05.04.1983
119	E155 ¹	<i>Juglans regia</i> L. 'Hartley'	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 4/15/2, 16.11.1987
120	E156 ¹	<i>Juglans regia</i> L. 'Hartley'	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 6, 19.06.1984
121	E325 ²	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	I Schwäbische Alp	getrocknet, C.q., Raumtemperatur
122	E326 ²	<i>Juglans regia</i> L.	I Bonn-Oberkassel	getrocknet, C.q., Raumtemperatur
123	E327 ²	<i>Prunus avium</i> L.	I Bonn	getrocknet, C.q., Raumtemperatur
124	E395 ²	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I Bornheim	getrocknet, C.q., Raumtemperatur
125	E648 ³	<i>Juglans regia</i> L.	I Frankreich	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur
126	E689 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Klövensteen	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 18.08.1992
127	E690 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Harsefeld	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 19.08.1997
128	E691 ⁷	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	O Warendorf	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 28.06.1999
129	E692 ⁷	<i>Rubus idaeus</i> L.	O Hauberg	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 09.09.1997
130	E693 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Neustadt/Titisee	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 18.06.2000
131	E694 ⁷	<i>Cornus</i> sp.	O Klövensteen	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 09.06.2000
132	E695 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Pinneberg	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 18.08.1997

Fortsetzung Tab. 2:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Herkunft	Lagerung / Referenz
133	E696 ⁷	<i>Betula pendula</i> Roth.	O Klövenstein	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 11.05.1995, gleicher Baum wie E111
134	E697 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Osdorfer Born	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 04.05.1993
135	E698 ⁷	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	O Idar-Oberstein	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 09.06.1992
136	E699 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Recklingen	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C
137	E700 ⁷	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	O Neuenberg	mit flüssigem Stickstoff zermörseres Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 12.07.1996
138	E797 ⁴	<i>Cornus florida</i> L.	I USA	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, WATERWORTH & LAWSON (1992), JONES (1973), JONES (1976)
139	E798 ⁴	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973)
140	E799 ⁴	<i>Sambucus racemosa</i> L.	I Deutschland	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, GIERSEIPEN, (1993)
141	E800 ⁴	<i>Juglans regia</i> L.	I UK	gefriergetrocknet C.q., Raumtemperatur
142	E801 ⁴	<i>Ulmus americana</i> L.	I USA	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)
143	E802 ⁴	<i>Rubus idaeus</i> L.	I NZ	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES <i>et al.</i> (1990)
144	E803 ⁴	<i>Prunus avium</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)
145	E804 ⁴	<i>Sambucus canadensis</i> 'Aurea'	I USA	gefriergetrocknet C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)
146	E805 ⁴	<i>Rubus procerus</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1976)
147	E806 ⁴	<i>Betula pendula</i> Roth.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur
148	E1636 ⁵	<i>Vitis vinifera</i> L.	O Neustadt/W.	bei 4 °C gelagertes Steckholz, gesammelt: 12/03
149	E1459 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CLRV Keglers	I Ascherleben	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 30.10.1980,
150	E1460 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 27.01.1980, CROPLEY (1961)
151	E1461 ⁶	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 20.07.1983, WALKEY (1973), SCOTT <i>et al.</i> (1992)
152	E1462 ⁶	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 24.7.1983, WALKEY (1973), SCOTT <i>et al.</i> (1992), SCOTT <i>et al.</i> (1992)
153	E1436 ⁶	<i>Populus nigra</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 20.12.1989
154	E1464 ⁶	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 08.01.1990, Scott <i>et al.</i> (1992)
155	E1465 ⁶	<i>Betula pendula</i> Roth., I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 04.05.1988, Scott <i>et al.</i> (1992)
156	E1466 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 15.6.1976, Cropley (1961)
157	E1467 ⁶	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 21.10.1991, Scott <i>et al.</i> (1992)

Fortsetzung Tab. 2:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanzenart	Herkunft	Lagerung / Referenz
158	E1468 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 24.01.1984, CROPLEY (1961)
159	E1469 ⁶	<i>Betula pendula</i> Roth, I ₂ IFFLEY	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 19.02.1991
160	E1470 ⁶	<i>Betula pendula</i> Roth., I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 14.09.1992, SCOTT <i>et al.</i> (1992)
161	E1471 ⁶	<i>Rheum rhabarbarum</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 25.11.1991, SCOTT <i>et al.</i> (1992)
162	E1472 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 29.03.1993, CROPLEY (1961)
163	E1473 ⁶	<i>Betula pendula</i> Roth., I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 17.02.1997, SCOTT <i>et al.</i> (1992)
164	E1474 ⁶	<i>Juglans regia</i> L.	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 18.04.1994
165	E1475 ⁶	<i>Walkeys Rhubarb Virus</i> 6, 762	I Wellesbourne, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 18.11.2003
166	E1476 ⁶	<i>Prunus avium</i> L., CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 12.11.2003, CROPLEY (1961)

C.q.: *Chenopodium quinoa*; O: Feldprobe; I: Isolat. ¹Rozália Zsovák-Hangyál vom Fejér Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat (Pflanzenschutzdienst) in Velence (Ungarn). ²Dr. J. Hamacher aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn. ³Dr. T. Candresse vom l'Institut de biologie végétale moléculaire (INRA) in Bordeaux (Frankreich). ⁴Dr. T. A. Jones vom Scottish Research Crop Institute in Dundee (Schottland, UK). ⁵U. Ipach vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz. ⁶Dr. I. Cooper vom Centre for Ecology and Hydrology (CEH) in Oxford (England, UK). ⁷Fachgebiet Phytomedizin des Institutes für Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin.

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Die eingesetzten genom-spezifischen Oligonukleotide (Primer) wurden aus Veröffentlichungen übernommen oder mit Hilfe des Internet Primer Design Programms 'Primer 3' (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entwickelt. Bei der Entwicklung wurden ausschließlich Primer ausgewählt, die zwischen 19 Basen und 22 Basen lang sind, deren G/C-Gehalt bei 50 % bis 60 % liegt, die am 3'-Ende möglichst die Base G oder C bzw. die Basen CG oder GC aufweisen, deren Schmelztemperatur (T_m) zwischen 55 °C und 80 °C liegt und die weder komplementäre noch untereinander kompatible Bereiche besitzen. Die verwendeten Primer und ggf. die dazugehörigen Referenzen sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: Synthetische Oligonukleotide, deren Orientierung, Nukleotidsequenz und Referenz

Cherry leaf roll nepovirus-genomspezifische Oligonukleotide			
3'UTR-spezifische Oligonukleotide			
Primerbezeichnung	Orientierung (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')	Referenz
CLRV-RW1	antisense	GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	WERNER <i>et al.</i> (1997)
CLRV-RW2	sense	TGGCGACCGTGTAAACGGCA	WERNER <i>et al.</i> (1997)
CLRV-RW2-rc	antisense	TGCCGTTACACGGTCGCCA	WERNER <i>et al.</i> (1997)
CLRV-CP-2	antisense	CAACGCTGCCATTACATCTTCAACC	ZHOU <i>et al.</i> (1998)
CLRV-CP-2-rc	sense	GGTTGAAGATGTGAATGGCAGCGTTG	ZHOU <i>et al.</i> (1998)
CLRV-CP-C	antisense	TCCTAGAGACAGCTAGGAAC	SCOTT <i>et al.</i> (1992)
CLRV-E603-3'Arev	antisense	ACACCCACCAAATGGATAGG	diese Arbeit
Hüllproteinregion-spezifische Oligonukleotide			
Primerbezeichnung	Orientierung (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')	Referenz
CLRV-CP-N	sense	CTGGTATGCATTGGTCGGCA	Scott <i>et al.</i> (1993)
CLRF-WCPF	sense	GCAAGTGAAGGATGATGCTGC	diese Arbeit
CLRV-WCPR	antisense	CAGCCTATTGCAATCACAGG	diese Arbeit
CLRV-CP-N-rc	antisense	TGCCGACCAATGCATACCAG	SCOTT <i>et al.</i> (1993)
Oligonukleotide, die vom 5'-Ende her ca. 150 bp vor der Hüllproteinregion liegen			
Primerbezeichnung	Orientierung (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')	Referenz
CLRV-CP-1	sense	GTACTCATTGGAGACTGCAGCGTTC	ZHOU <i>et al.</i> (1998)
CLRV-CP-1-rc	antisense	GAACGCTGCAGTCTCCAATGAGTAC	ZHOU <i>et al.</i> (1998)
pGEM®-T-Plasmid-spezifische Oligonukleotide			
Primerbezeichnung	Orientierung (5' → 3')	Sequenz (5' → 3')	Referenz
M13'pUC	sense	GTAAAACGACGGCCAGT	Promega
M13'pUCrev	antisense	CAGGAAACAGCTATGAC	Promega

rc = revers-komplementär

2.4 Antikörper

Das verwendete polyklonale Antiserum wurde gegen ein CLRV-Isolat aus Gemeiner Esche (*Fraxinus excelsior* L.) in Kaninchen produziert (GIERSEPEN, 1993) und freundlicherweise von Dr. J. Hamacher aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Die Protein-Konzentration der gereinigten IgG-Fraktion wurde mit dem Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 bei einer optischen Dichte (OD) von 280 nm gemessen und betrug 0,8 mg/ml.

2.5 Bakterienstämme

Die *Escherichia coli*-Stämme JM109 (Promega), DH5 α (HANAHA, 1983) oder XL1Blue MRF' (Stratagene) wurden für die Klonierung verwendet.

2.6 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Alle Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden mit demineralisiertem Wasser (H₂O_{demin}) angesetzt. Das demineralisierte Wasser wurde bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert. Wurden die Puffer und Nährmedien nach der Zugabe aller Chemikalien zum demineralisierten Wasser nochmals autoklaviert, wurde dies im Protokoll angegeben. Für die Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet, das mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und über Nacht unter dem Abzug gerührt wurde (H₂O_{DEPC}). Zur Neutralisierung des DEPC wurde das Wasser anschließend autoklaviert.

2.7 Biotest und Indikatorpflanzen

Da phytopathogene Viren im holzigen Pflanzengewebe ihrer natürlichen Wirte in vielen Fällen in niedrigen Konzentrationen vorliegen und nicht immer eindeutige Symptome aufweisen, wurden zur Virusvermehrung und zur Bestimmung eines typischen Wirtspflanzenkreises virusempfindliche krautige Testpflanzen im Biotest eingesetzt. Die Auswahl der krautigen Testpflanzen stützen sich auf Berichte von SCHMELZER (1966), SCHIMANSKI *et al.* (1975a), HORVÁTH (1979) und JONES (1985). Nachfolgend beschriebene krautige Testpflanzen wurden für den Biotest verwendet:

Chenopodium quinoa Willd.

Chenopodium amaranticolor Coste & Reyn

Chenopodium foetidum Schrad.

Nicotiana benthamiana Domin.

Nicotiana clevelandii Gray

Nicotiana glauca Grath.

Nicotiana tabacum var. *Samsun* L.

Nicotiana tabacum var. *Xanthi* L.

Nicotiana rustica (L.)

Die Anzucht der Indikatorpflanzen erfolgte in der Versuchsstation des Institutes für Gartenbauwissenschaften der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin. Die Indikatorpflanzen wurden auf Einheitserde 0 (Gramoflor) in Schalen

ausgesät, nach dem Keimen in 10 cm-Töpfe mit Einheitserde P (Gramoflor) pikiert und bei 18 °C bis 22 °C kultiviert. Für die kurze Kulturdauer war keine Düngung erforderlich. Bewässert wurde über eine Tröpfchenbewässerung, die einmal am Tag ca. 25 ml Wasser abgibt. Es wurde je nach Bedarf nachgewässert. In den Wintermonaten wurden die Pflanzen 12 Stunden lang mit einer 400 Watt HD-Natrium-Lampe (Son-T AGRO-Lampe, Phillips) zusätzlich belichtet. Es wurde nach Bedarf gegen Blattläuse, Weiße Fliege, Trauermücke, Minierfliege und Spinnmilben gespritzt (Tab. 4). Als Indikatorpflanzen für die Versuche zur Übertragung des CLRV aus Gehölzen diente ausschließlich *Chenopodium quinoa*. Auch die aus Gehölzen isolierten Viren wurden in *C. quinoa* vermehrt. Zum Homogenisieren des Pflanzenmaterials wurde Kalium-Phosphatpuffer verwendet, da Phosphationen die Infektiosität von Viren in Blatthomogenaten steigern können (FULTON, 1966). Die Inokulation der Indikatorpflanzen erfolgte durch Extraktionsinokulation im 4. bis 6. Blattstadium nach GIERSEIPEN (1993).

Puffer und Reagenzien:

Inokulationspuffer: 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (aus einer Mischung äquimolarer KH_2PO_4 - und K_2HPO_4 -Lösungen)

Tab. 4: Zusammenstellung der chemischen Bekämpfungsmittel, deren Aufwandmengen und Wirkung

Name	Firma	Aufwandmenge	Wirkstoff / Wirkungsbereich
Actellic® 50	Syngenta Agro GmbH	0,5 % (v/v)	Pirimiphos-methyl / Insektizid
Applaud®	Syngenta Agro GmbH	0,03 % (v/v)	Buprofezin / Insektizid
Bulldock®	Makhteshim-Agan Deutschland GmbH	0,03 % (v/v)	beta-Cyfluthrin / Insektizid
Decis® flüssig	Bayer CropScience Deutschland GmbH	0,03 % (v/v)	Deltamethrin / Insektizid
MASAI®	BASF Aktiengesellschaft	0,2 % (w/v)	Tebufenpyrad / Akarizid
Plenum® 50 WG	Syngenta Agro GmbH	0,12 % (w/v)	Pymetrozin / Insektizid

2.8 Virusreinigung aus krautigen Indikatorpflanzen

Zur Aufreinigung von CLRV-Partikeln wurde eine modifizierte Methode nach GIERSEIPEN (1993) angewandt. Die Aufreinigung erfolgte stets aus infiziertem, nicht nekrotisiertem Blattmaterial von *Chenopodium quinoa*. Geerntet wurde 5 Tage nach Inokulation und es wurden ca. 500 g frisches Blattmaterial zur Aufreinigung eingesetzt. Alle Ultrazentrifugationen wurden in einer Ultrazentrifuge der Beckman Coulter vom Typ Optimale 80 K durchgeführt. Der Virusgehalt wurde durch Extinktionsmessung bei OD_{260} mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer bestimmt und die Viruskonzentration anschließend nach dem für das *Blueberry leaf mottle nepovirus* (BLMV) veröffentlichten Extinktionskoeffizienten abgeschätzt. Dabei entspricht der Extinktionswert von 10 einer

Viruskonzentration von 1 mg/ml ($A_{0,1\%,1\text{ cm}}$ bei 260 nm = 10,0; RAMSDELL & STACE-SMITH, 1983).

Durchführung:

Pflanzenmaterial mit ca. 500 ml Extraktionspuffer versetzen und im Mixer zerkleinern
(bei 4 °C im Kühlraum)



Homogenat durch ein autoklaviertes mit Extraktionspuffer angefeuchtetes Mulltuch pressen
(2- bis 4-lagig, ergibt 2 x 450 ml Presssaft)



Homogenat in sterilen Duranflaschen bei -20 °C einfrieren



Duranflaschen mit dem Pflanzenpresssaft zum Auftauen über 2 Nächte in den Kühlschrank stellen



20 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugieren (HETTICH Zentrifuge Universal 16R;
sedimentiert Pflanzenreste, die mit durch das Mulltuch gepresst wurden; Überstand ist gelb-
grün und klar; insgesamt ca. 400 ml)



60 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei 4 °C (im Kühlraum) unter Rühren langsam zu 400 ml Überstand
hinzugeben (15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /100 ml) und über Nacht rühren lassen (Salzfällung)



20 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugieren (HETTICH Zentrifuge Universal 16R;
sedimentiert die durch das Ammoniumsulfat gefällten Proteine)



Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen füllen (Optiseal, Polyallomer Zentrifugenröhrchen,
Beckmann)



2 h bei 165000 x g und 4 °C ultrazentrifugieren (Rotor Ti70, Beckmann; 2 Durchläufe;
insgesamt 14 Röhrchen)



Überstand mit 20 cm langer Kanüle absaugen und werfen

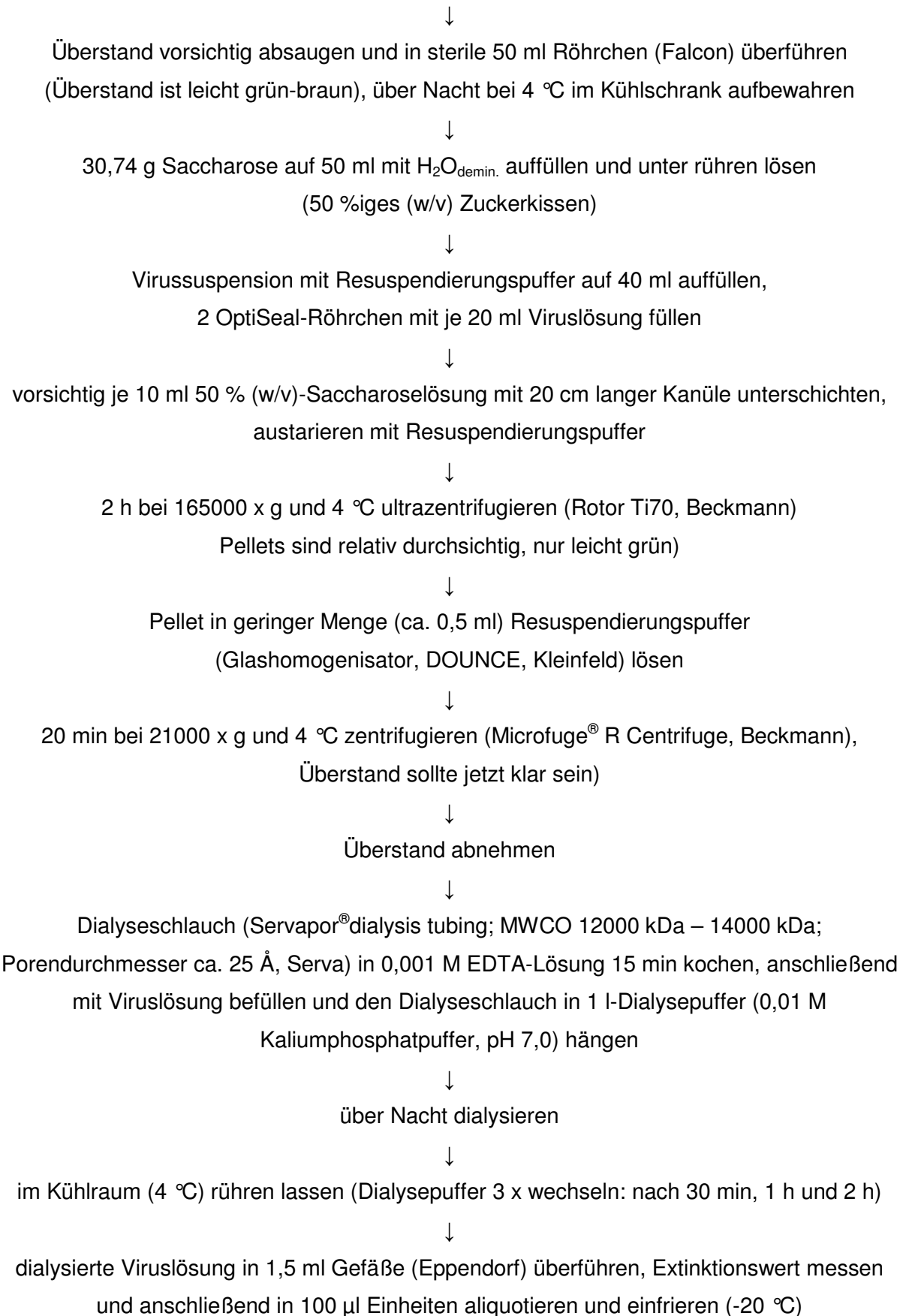


Pellets in ca. 25 ml Resuspendierungspuffer resuspendieren (Glashomogenisator, DOUNCE,
Kleinfeld)



20 min bei 23000 x g und 4 °C zentrifugieren (Jouan GR 2022)





Puffer und Reagenzien:

Dialysepuffer:	0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (aus einer Mischung äquimolarer KH_2PO_4 - und K_2HPO_4 -Lösungen)
Extraktionspuffer:	0,5 M Boratpuffer pH 6,7 0,1 % (v/v) DIECA 0,1 % (w/v) Thioglycolsäure
Resuspendierungspuffer:	0,06 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (aus einer Mischung äquimolarer KH_2PO_4 - und K_2HPO_4 -Lösungen) 0,01 M EDTA

2.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung von Pflanzenviren in Pflanzensaftthomogenaten ist ein schnelles und einfaches Verfahren, um eine Virusinfektion nachzuweisen. Anhand der Partikelmorphologie (Länge, Durchmesser, Form, Oberflächenstruktur) können in elektronenmikroskopischen Verfahren Hinweise zur Identität eines Virus und zum Vorliegen von Mischinfektionen erhalten werden. Alle eingesammelten Proben wurden mittels Standard-Elektronenmikroskopie (HORNE & WILDY, 1963) überprüft. Für diese Untersuchungen wurden Kupfernetze verwendet, die mit einem Pioloformfilm beschichtet und zur Stabilität mit Kohle bedampft worden waren. Die Präparate wurden mit dem ZEISS EM 10 C Elektronenmikroskop ausgewertet.

Durchführung:

infiziertes Pflanzenmaterial in geringer Menge Puffer zerkleinern (ca. 1:50, Pflanzensaft sollte bei krautigen Pflanzen hellgrün sein)



auf einem Streifen Parafilm ein Tropfen Pflanzensaft (10 µl), 3 Tropfen $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ (40 µl) und 1 Tropfen 2 %ige Uranylacetatlösung (10 µl, UAc vor jedem Gebrauch 2 min bei 20000 x g zentrifugieren und aus der Mitte entnehmen) in einer Reihe auftragen



ein Kupfernetz mit der befilmten Seite nach unten für mindestens 2 min auf den Tropfen mit dem Pflanzensaft legen

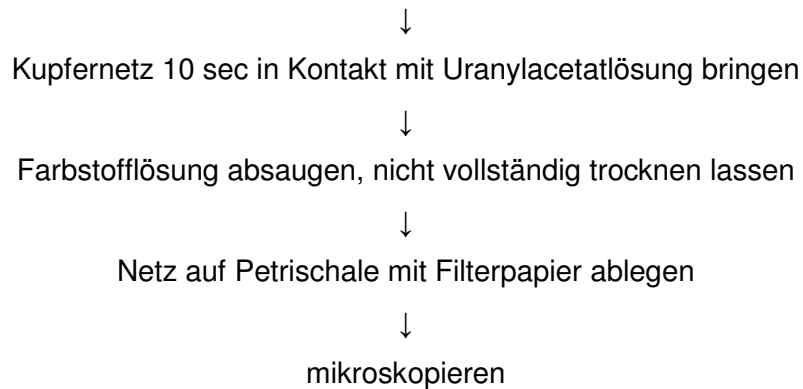


Kupfernetz mit Pipette aufnehmen und Flüssigkeit mit Filterpapier vorsichtig absaugen, nicht ganz trocknen lassen



Kupfernetz zum Waschen nacheinander auf die drei Wassertropfen auflegen





Puffer und Reagenzien:

Probenpuffer: 0,01 M Na-K-Phosphatpuffer; pH 7,4 (1 x PPK-Puffer)

Kontrastierung: 1 % (w/v) Uranylacetatlösung (UAc) in H₂O

2.10 Immunocapture - Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion als Standardnachweis des CLRV

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht durch ihre hohe Empfindlichkeit einen verlässlichen Nachweis auch geringer Konzentrationen eines Erregers. Um die Hemmwirkung möglicher im Pflanzensaft verschiedener Gehölze auftretender Substanzen gegen die in der Reversen Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ablaufenden enzymatischen Reaktionen zu minimieren, wurde die IC-RT-PCR eingesetzt. Hierbei wurden die Reaktionsgefäße zuerst mit CLRV-spezifischen Antikörpern (Kapitel 2.4) beschichtet. Die Viruspartikel werden dadurch gebunden und anschließend durch mehrmaliges Waschen vom Pflanzensaft getrennt. Als Ausgangsmaterial für die spezifische Bindung der Viruspartikel kann Blattmaterial von holzigen sowie von krautigen Pflanzen verwendet werden. Die IC-RT-PCR wurde leicht modifiziert nach den Angaben von WERNER *et al.* (1997) durchgeführt. Das hierbei verwendete Primerpaar (RW1 und RW2) basiert auf übereinstimmenden Sequenzen von 5 CLRV-Birken-Isolaten innerhalb der hochkonservierten 3'-terminalen Region (3'UTR) des Virusgenoms. Unter Verwendung dieses Primerpaars kann mittels IC-RT-PCR innerhalb dieses 3'-terminalen nicht-kodierenden Virusgenoms ein ca. 420 Basenpaare langes Fragment amplifiziert und im 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt werden.

2.10.1 Immunocapture - Bindung der Viruspartikel an die Gefäßwand

Um die CLRV-Partikel zu binden, wurden 0,5 ml Multiply[®]-Pro Gefäße (Polypropylen, Sarstedt) mit 50 µl CLRV-IgG-Lösung in Beschichtungspuffer verdünnt (Verdünnung 1:250, Endkonzentration: 3,2 µg/µl) und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 150 µl Waschpuffer dreimal für 3 min gewaschen und direkt für das virusinfizierte Pflanzenhomogenat eingesetzt.

Puffer und Reagenzien:

10 x PPK- Puffer: 80 g NaCl; 2 g KH₂PO₄; 14,4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2 g KCl; mit H₂O_{demin.} auf 1 l auffüllen, pH 7,4

Beschichtungspuffer: 1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; mit H₂O_{demin.} auf 1 l auffüllen, pH 9,6

Waschpuffer: 1 x PPK; 1 % (v/v) Tween 20

2.10.2 Aufschluss virusinfizierten Blattmaterials

Für den Aufschluss von virusinfiziertem Pflanzenmaterial wurde mit einer Ausgangsmenge von 100 mg frischem Blattmaterial gearbeitet. Blatthomogenate von holzigen Pflanzen, die hohe Anteile an Schleimstoffen aufweisen, wurden im Verhältnis 1:20 (w/v) mit Probenpuffer verdünnt.

Durchführung:

Blattmaterial in Probenpuffer (Verdünnung 1:10, w/v) mit Mörser und Pistill homogenisieren

↓

Zentrifugation bei 2500 x g für 30 sec (Überstand weiterverwenden)

↓

in beschichtete Eppendorfreaktionsgefäße jeweils 50 µl Pflanzenextrakt pipettieren

↓

Inkubation über Nacht bei 4 °C

↓

3 x mit je 150 µl Waschpuffer waschen, anschließend kräftig ausklopfen

Puffer und Reagenzien:

Probenpuffer: 1 x PPK; 0,1 % (v/v) Tween 20; 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP, Mr 40000)

Waschpuffer: 1 x PPK; 1 % (v/v) Tween 20

2.10.3 Reverse Transkription zur Erststrang-cDNA-Synthese für CLRV

Die cDNA-Synthese wurde mit dem zur Virus-RNA revers-komplementären Primer (RW1, 2.3) durchgeführt. Für die Reverse Transkription wurde das Enzym *Moloney Murine Leukemia Virus* - Reverse Transkriptase (RevertAid™M-MuLV Reverse Transcriptase, ^{MBI}Fermentas) verwendet. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis.

Durchführung:

20 µl RT-Reaktionsmix in 0,5 ml Multiply®-Pro Gefäße (Polypropylen, Sarstedt) pipettieren

↓

RT-Reaktionsmix für eine Probe

Volumen in µl	Chemikalie (Konzentrationsangabe)	Endkonzentration
4	5 x Reaktionspuffer*, ^{MBI} Fermentas	1 x
2	dNTP (10 mM), ^{MBI} Fermentas	1 mM
2	Primer CLRV-RW1 (50 pmol/µl), Carl Roth GmbH	5 µM
1	M-MLV-RT (200 U/µl), ^{MBI} Fermentas	200 U
11	H ₂ O _{DEPC}	
20	Gesamt	

* 500 mM Tris-HCl (pH 8,3) mit 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂ und 100 mM DTT

↓

Inkubation für 1 h bei 37 °C

↓

Hitzedenaturierung für 3 min bei 95 °C

↓

sofort auf Eis stellen, 1 min abkühlen lassen, anschließend kurz runter zentrifugieren

↓

Proben auf Eis stellen und direkt für die PCR verwenden oder bei -20 °C lagern

2.10.4 Amplifikation von cDNA-Abschnitten mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte Abschnitte einer DNA amplifiziert und anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt und durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Als Matrize für die PCR diente die cDNA, die mittels Reverser Transkription synthetisiert wurde.

Durchführung:

4 µl cDNA mit 96 µl PCR-Reaktionsmix in 0,2 ml Multiply®-Pro Gefäßen (Sarstedt) mischen
(auf Eis)



PCR-Reaktionsmix für eine Probe

Volumen in µl	Chemikalie (Konzentrationsangabe)	Endkonzentration
4	cDNA	
10	10 x Reaktionspuffer*, ^{MBI} Fermentas	1 x
6	MgCl ₂ (25 mM), ^{MBI} Fermentas	1,5 mM
0,4	Primer CLRV-RW1 (50 pmol/µl), Carl Roth GmbH	200 nM
0,4	Primer CLRV-RW2 (50 pmol/µl), Carl Roth GmbH	200 nM
2,5	<i>Taq</i> Polymerase (1 U/µl), ^{MBI} Fermentas	2,5 U
76,7	H ₂ O _{DEPC}	
100	Gesamt	

* 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) mit 500 mM KCl, 8 % (w/v) Nonidet P40



Amplifikation in Stratagene Robocycler Gradient 96 (Stratagene) unter den nachfolgend
aufgeführten Bedingungen durchführen



Polymerase Kettenreaktion in 35 Zyklen (Zeitdauer: 1:33 h)

	Temperatur	Zeit	
Vorbehandlung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	35 x
Primer-Anlagerung	51 °C	0,5 min	
Kettenverlängerung	72 °C	0,5 min	
Nachbehandlung	51 °C	2 min	
	72 °C	5 min	
	6 °C	∞	



Lagerung der Amplifikate bei -20 °C

2.10.5 Optimierte Protokoll zum PCR-Massentest auf CLRV-Infektion

Zum CLRV-Nachweis größerer Probenmengen wurde das in Kapitel 2.10 beschriebene IC-RT-PCR-Verfahren optimiert. Dies ermöglichte eine einfachere Handhabung, da alle Schritte für eine Probe in demselben 0,2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt werden konnten. Somit

wird das Verfahren durch den verringerten Antikörper- und Enzymbedarf kostengünstiger. Es konnten in einem Durchlauf 96 Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Für die Bindung der CLRV-Partikel an die Gefäßwand wurden 10 µl einer CLRV-IgG-Verdünnung und 0,2 ml-Reaktionsgefäße (Thin-wall tube, 8 strip, Stratagene) verwendet. 4 bis 6 Knospen der Gehölzproben wurden in 1 ml Probenpuffer in Plastiktüten (ca. 8,5 cm x 9,7 cm, Klar pac GmbH) im Verhältnis 1:10 (w/v) mit einem Handhomogenisator zerkleinert. Zum Waschen wurden 100 µl Waschpuffer und eine 8-Kanal-Pipette (Titertek) verwendet. In die Reverse Transkription wurde 10 µl RT-Reaktionsmix je Probe und anschließend der gesamte RT-Ansatz in einem 50 µl PCR-Reaktionsmix eingesetzt. Der PCR-Ansatz beinhaltet 10 µl cDNA, 1 x Reaktionspuffer (^{MBI}Fermentas), 2 mM MgCl₂, 200 nM Primer CLRV-RW1, 200 nM Primer CLRV-RW2, 2 U Taq DNA Polymerase (rekombinant, 1 U/µl, ^{MBI}Fermentas). Die PCR wurde im Robocycler Gradient 96 (Stratagene) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94 °C für 2 min; 30 Zyklen: 94 °C für 1 min, 45 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec; 72 °C für 5 min; 6 °C.

2.11 IC-RT-PCR zum CLRV-Nachweis in Insekten

Zum Nachweis von CLRV in bzw. an Insekten, wurden Insekten mittels Klopfprobe (kräftiges Schütteln an den Baumästen und Auffangen der Insekten mit einem Fangkorb) an CLRV-infizierten Bäumen gesammelt und das in Kapitel 2.10 beschriebene IC-RT-PCR-Verfahren angewandt. Die verschiedenen Insektenarten wurden jeweils zusammen mit Mörser und Pistill in 200 µl Probenpuffer homogenisiert und 50 µl des Homogenats für die IC-RT-PCR eingesetzt.

2.12 IC-RT-PCR zur Amplifikation des Hüllproteins von CLRV-Isolaten

Diese PCR-Methode wurde von ZHOU *et al.* (1998) entwickelt und modifiziert als IC-RT-PCR zur Amplifikation eines ca. 1,8 kb großen Fragments eingesetzt, das die Hüllprotein kodierende Region (coat protein region, CP-Region, ca. 1,5 kb Gesamtlänge) von CLRV eingrenzt. Die Primersequenzen sind aus den genomischen Nukleotidsequenzen der CLRV-Walnuss-Isolate WRS (Italien), Wsp (Spanien), WOX (England) und W8 (Kalifornien) abgeleitet worden (ZHOU *et al.*, 1998). Symptomtragende Blätter krautiger Indikatorpflanzen wurden in ELISA-Probenpuffer (1:10, w/v) verdünnt. Die Bindung der Partikel an die Gefäßwand wurde in 0,5 ml Multiply[®]-Pro Gefäße (Polypropylen, Sarstedt) mit 50 µl CLRV-IgG (Endkonzentration: 3,2 µg CLRV-IgG/µl Beschichtungspuffer) und 50 µl Pflanzenextrakt durchgeführt und für 3 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 Stunde. Der RT-Mastermix (20 µl) setzt sich wie folgt zusammen: 1 x Reaktionspuffer* (^{MBI}Fermentas), 1 mM dNTP (Carl Roth), 10 ng Primer CLRV-CP2, 100 U M-MLV-RT (^{MBI}Fermentas). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen

durchgeführt: 94 °C 2 min; 35 Zyklen: 94 °C 1 min, 55 °C 1,5 min, 70 °C 1 min; 70 °C 7 min; 6 °C. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermix (100 µl) war: 20 µl cDNA, 1 x Reaktionspuffer (^{MBI}Fermentas), 1 mM MgCl₂, 2 ng/µl Primer CLRV-CP1, 5 U *Taq* DNA Polymerase (recombinant, 5 U/µl, ^{MBI}Fermentas).

2.13 RT-PCR zur Amplifikation unbekannter Genombereiche

Zur Amplifikation unbekannter Genombereiche von CLRV wurden aufgereinigte Viruspartikel (2.8) direkt zur Erststrang-Synthese eingesetzt.

2.13.1 RT-PCR zur Amplifikation einer 813 bp langen Region in der 3'UTR

Die Amplifikation der 813 bp langen Region, ausgehend von der bekannten 420 bp langen 3'UTR, Richtung 5'-Ende erfolgte mittels RT-PCR unter nachfolgend beschriebenen Bedingungen.

Durchführung:

Reverse Transkription

13 µl des Reaktionsmix in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettieren

↓

RT-Reaktionsmix für eine Probe (Teil 1):

Volumen in µl	Chemikalie (Konzentrationsangabe)	Endkonzentration
5	aufgereinigtes CLRV-Präparat	0,4 µg/µl
2	Primer RW2rc (50 pmol/µl)	5 µM
6	H ₂ O _{DEPC}	
13	Gesamt	

↓

5 min im Wasserbad kochen und sofort auf Eis stellen

↓

kurz abkühlen lassen und anschließend kurz zentrifugieren

↓

7 µl folgender Reagenzien hinzu pipettieren:

↓



RT-Reaktionsmix für eine Probe (Teil 2):

Volumen in µl	Chemikalie (Konzentrationsangabe)	Endkonzentration
4	5 x Reaktionspuffer, MBIFermentas	1 x
2	dNTP (10 mM)	1 mM
1	M-MLV-RT (200 U/µl)	200 U
7	Gesamt	



Inkubation bei 37 °C für 60 min



anschließend auf Eis stellen

Polymerase Kettenreaktion

80 µl PCR-Mastermix zum RT-Produkt hinzu pipettieren



PCR-Reaktionsmix für eine Probe

Volumen in µl	Chemikalie (Konzentrationsangabe)	Endkonzentration
10	cDNA	
10	10 x Reaktionspuffer	1 x*
6	MgCl ₂ (10 mM)	1,5 mM
0,4	Primer RW2rc (50 pmol/µl)	200 nM
0,4	Primer CP2rc (50 pmol/µl)	200 nM
76,7	H ₂ O _{DEPC}	
2,5	Taq DNA Polymerase (recombinant, 1 U/µl), ^{MBI} Fermentas	2,5 U
100	Gesamt	

*10 mM Tris-HCl (pH 8,8) mit 50 mM KCl, 0,8 % (w/v) Nonidet P40



Amplifikation im PCR-Gerät Eppendorf Autogene II Grant mit 35 Zyklen unter den
nachfolgend aufgeführten Bedingungen



↓

	Temperatur	Zeit	
Vorbehandlung	95 °C	2 min	
Primer-Anlagerung	55 °C	0,5 min	35 x
Kettenverlängerung	72 °C	1,5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Nachbehandlung	72 °C	7 min	
	6 °C	∞	

↓

Lagerung der Amplifikate bei 4 °C

2.13.2 RT-PCR zur Amplifikation einer 393 bp langen Region in der 3'UTR

Die Erststrangsynthese und die Polymerase-Kettenreaktion wurden unter Verwendung des Erststrang-Primers E603-CP-3'Arev analog zu den Angaben in 2.13.1 durchgeführt. Die Amplifikation in der PCR wurde im Eppendorf Mastercycler personal mit einer Vorbehandlungszeit bei 95 °C für 2 min, einem Zyklus in 35facher Wiederholung mit 0,5 min Primeranlagerung bei 45 °C, 1 min Kettenverlängerung bei 72 °C und 0,5 min Denaturierung bei 95 °C durchgeführt. Als Zweitstrangprimer diente CLRV-CP2-rc. Die Primeranlagerungstemperatur wurde nach jedem Zyklus um 0,5 °C erhöht (Temperaturrampe). Die Nachbehandlung erfolgte für 7 min bei 72 °C.

2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989). Agarose mit einer Endkonzentration von 1 % (w/v) wird in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, die Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt, in eine Horizontalgelkammer gegossen und ein analytischer Kamm eingesetzt bis das Gel erstarrt ist. Anschließend wurde der Kamm entfernt. 12 µl Probe wurde mit 2 µl 5 x Ladepuffer gemischt und in die Kammern geladen. Die Dauer der Gelelektrophorese war abhängig von der verwendeten Gelkammer. Die Elektrophorese wurde in der Regel für 1,5 h bei 80 V bis 100 V Spannung durchgeführt, was bei den meisten Gelkammern einer Laufspannung von 3-4 V/cm entspricht. Nach Ende des Laufes wurde das Gel zum Anfärben der DNA-Banden für 15 min bis 30 min in einem Ethidiumbromid-Färbegrad (1 µg EtBr / ml 1 x TBE) geschwenkt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid, welches unter UV-Licht fluoresziert, wurden die DNA-Banden auf einen UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe einer Videokamera (BiodocAnalyse, Biometra) fotografiert.

Puffer und Reagenzien:

10 x TBE:	108 g Tris-Base
	55 g Borsäure
	40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	auf 1 l H ₂ O _{demin.}
5 x Ladepuffer:	100 mM EDTA, pH 8,0
	50 % (v/v) Glyzerin
	0,025 % (w/v) Bromphenolblau
	0,025 % (w/v) Xylencyanol

2.15 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen und wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden durch Auftrennung von je 1 µl aufgereinigter DNA-Suspension im Agarose-Gel durch den Vergleich mit einem DNA-Marker bekannter DNA-Konzentration abgeschätzt.

2.16 Klonierung von DNA in *Escherichia coli*

Um die vollständige Sequenz der Amplifikate zu erhalten und um die Variabilität der Basenzusammensetzung von Teilbereichen der genomischen Virus-RNA-Moleküle innerhalb von genomischen RNA-Populationen von CLRV-Isolaten zu untersuchen, wurden die IC-RT-PCR-Amplifikate der CLRV-Isolate in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien (2.5) kloniert und anschließend sequenziert (2.19).

2.16.1 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Plasmid-Vektor

DNA-Fragmente aus der PCR wurden mit 0,5 µl Vektor-DNA (pGEM®-T Easy, Promega) im molaren Verhältnis von 3:1 verknüpft. Die linearisierte Vektor-Plasmid-DNA besitzt an beiden 3'-Enden jeweils einen Überhang eines Thymidin-Monomers was ein effektives Zusammenfügen von Vektor-Fragmenten und PCR-Fragmenten, die an den 3'-Enden jeweils einen Überhang eines Adenosin-Monomers besitzen, mit Hilfe der T4-Ligase (Promega) ermöglicht. Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt.

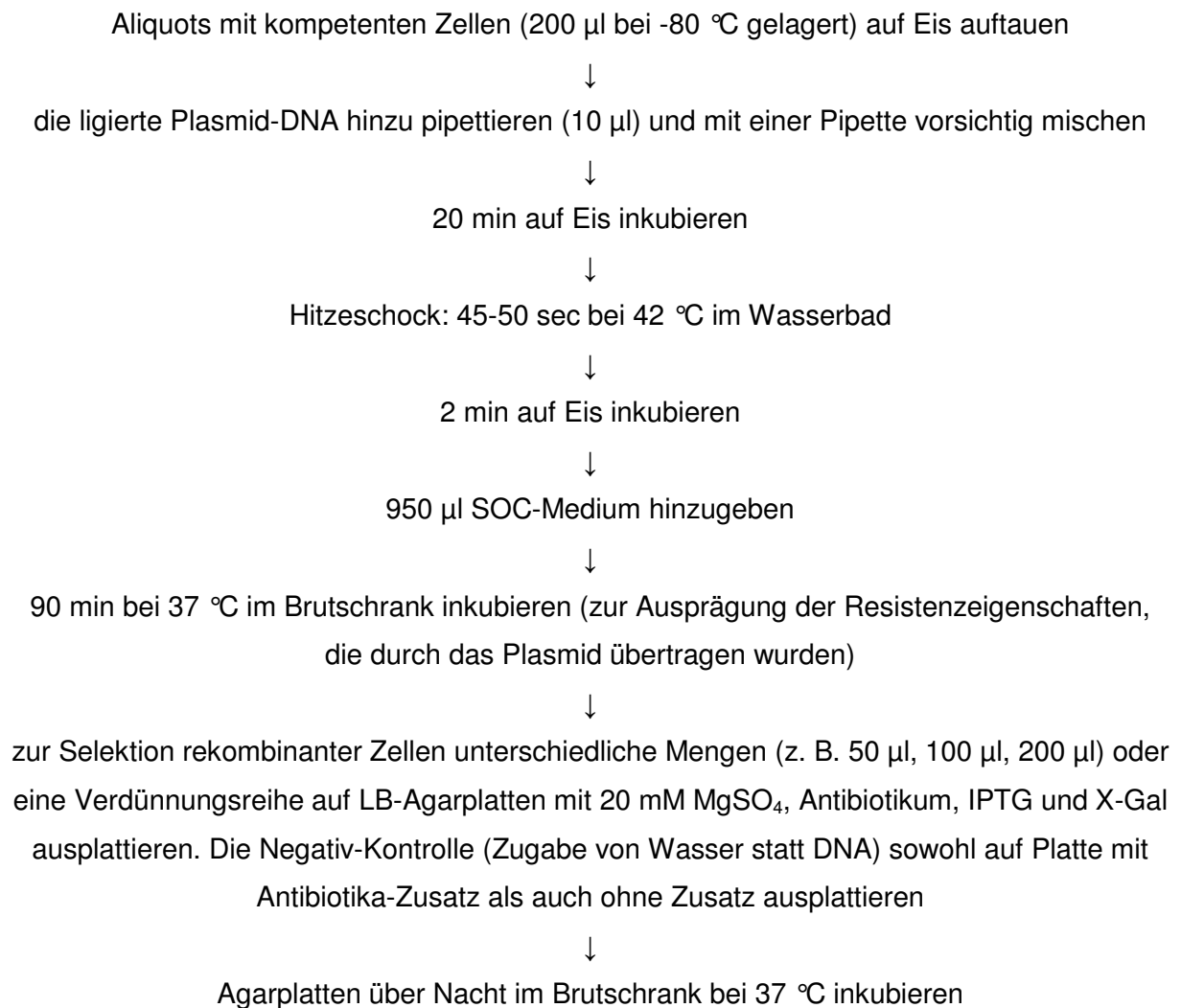
2.16.2 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Bakterien nehmen normalerweise keine DNA aus dem Milieu auf. Eine spezielle Behandlung mit Salzmischungen kann jedoch die Aufnahme von ringförmiger Plasmid-DNA während eines leichten Hitzeschocks der kompetenten Zellen ermöglichen. Die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellsuspensionen zur Transformation mit DNA erfolgte analog zu den Angaben von HANAHAN (1983).

2.16.3 Transformation von Bakterienzellen mit rekombinanter DNA

Die Transformation erfolgte leicht modifiziert nach dem pGEM®-T Easy-Vektor-Protokoll der Firma Promega.

Durchführung:



Medien zur Anzucht und Transformation von E. coli:

LB-Agar:	1,5 % (w/v) Agar 1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl in H ₂ O _{demin.} (pH 7,0), autoklavieren
LB Flüssigmedium:	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl auf 1 l H ₂ O _{demin.} (pH 7,0)
LB-AIX:	LB-Agar mit folgenden Endkonzentrationen: 50 µg Amp/ml; 30 µg IPTG/ml und 40 µg X-Gal/ml
SOB-Flüssigmedium:	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Nach dem Autoklavieren des Mediums aus 1 M steril filtrierten Stammlösungen auf Endkonzentrationen 10 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O; 10 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O zugegeben.
SOC-Flüssigmedium:	entspricht SOB-Medium mit 20 mM Glukose. Nach dem Autoklavieren aus 1 M steril filtrierter Glukose-Stammlösung 20 ml/l SOC-Medium zugeben.

Reagenzien:

IPTG-Lösung:	die Stammlösung in H ₂ O _{demin.} herstellen durch Lösen von 238,3 mg IPTG in 10 ml H ₂ O _{demin.} (0,1 M), anschließend durch einen 0,22-mikron Filter steril filtrieren. Die Lösung in 1 ml-Portionen aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.
X-Gal-Lösung:	die Stammlösung in Dimethylformamid mit einer Konzentration von 20 mg/ml herstellen, in Eppendorfgefäßen aliquotieren, bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahren.
Amp-Stammlösung:	50 mg Ampicillin/ml H ₂ O _{demin.} in 1 ml Aliquots lösen, bei 4 °C für kurze Zeit aufbewahren.

2.16.4 Identifizierung von rekombinanten Transformanden-Kolonien

Eine T7- und SP6- RNA-Polymerase-Promoter-Region begrenzt innerhalb der Kodierungsregion des α -Peptids der β -Galaktosidase eine multiple Klonierungsregion im pGEM[®]-T Easy-Vektor. Das durch das DNA-Insert inaktivierte α -Peptid des rekombinanten Klon ermöglicht ein direktes Farb-Screening. Transformanden mit rekombinanten Plasmiden bilden weiße Kolonien, Transformanden, die Plasmide ohne Insertionen aufgenommen haben, bilden blaue Kolonien. Die Überprüfung der Klone erfolgte durch Blue/White-Screening auf LB-AIX und einem anschließenden PCR-Screening. Zur Identifizierung der rekombinanten Plasmide und zur Überprüfung der Insert-Länge wurden für die 420 bp langen Inserts (2.10) die fragmentspezifischen RW1/RW2-Primer (2.3) und bei allen anderen Klonierungen die vektorspezifischen M13'pUC/M13'pUCrev-Primer (2.3) für die PCR eingesetzt. Die einzelnen Kolonien wurden durch Überimpfen direkt auf eine Masterplatte (LB-AIX) und anschließend in einen 100 μ l PCR-Ansatz mit einer sterilen Pipettenspitze überführt. Der Reaktionsmix mit den Primern RW1/RW2 wurde analog zu den Angaben in Kapitel 2.9.4 durchgeführt und enthielt zusätzlich 1 mM dNTP. Die PCR wurde mit den M13'pUC/M13'pUCrev-Primern in einem 100 μ l-Ansatz durchgeführt und enthält folgende Komponenten: 1 x Reaktionspuffer (^{MBI}Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 500 nM Primer M13'pUC, 500 nM Primer M13'pUCrev, 2,5 U *Taq* DNA Polymerase (recombinant, 1 U/ μ l, ^{MBI}Fermentas). Das PCR-Programm beinhaltete folgende Schritte: 95 °C 2 min; 35 Zyklen: 95 °C 1 min, 55 °C 2 min, 70 °C 3 min, 70 °C 5 min; 6 °C. Es wurden 10 μ l des Reaktionsansatzes im nativen Agarose-Gel (2.14) aufgetrennt.

2.17 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienzellen

Nach Identifizierung der rekombinanten Klone wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA das NucleoSpin[®] Plasmid Kit der Firma Macherey & Nagel nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.18 Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Zur Kontrolle des klonierten Fragments durch gezieltes Ausschneiden des Inserts aus dem Plasmid und anschließender Größenermittlung und zur Mengenabschätzung der isolierten Plasmide wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym *Eco* RI (Promega) durchgeführt. Die Restriktion erfolgte nach den Herstellerangaben. Dazu wurde ca. 1 μ l der Plasmid-Lösung bei 37 °C 1 h mit dem Enzym inkubiert. Der gesamte Restriktionsansatz (20 μ l) wurde in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.14).

2.19 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der aufgereinigten Plasmid-DNA mit Insertionen wurden von den Firmen SequiServe und SeqLab und von Dr. M. Reißmann vom Zentrum für molekulare Analytik der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit 7.4 (HALL, 1999).

2.20 Phylogenetische Sequenzanalysen

Zum Vergleich von Sequenzen und zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums wurden drei verschiedene mathematische Verfahren (Algorithmen), das Neighbor joining-Verfahren (distance matrix method), das Maximum parsimony-Verfahren und das Maximum likelihood-Verfahren verwendet. Um die biologische Relevanz eines erstellten Stammbaums abzusichern, ist es erforderlich die Daten mit allen drei Verfahren zu analysieren und die erhaltenen Stammbäume miteinander zu vergleichen. Das Neighbor joining-Verfahren (SAITOU & NEI, 1987) wurde mit Hilfe des Computerprogramms ClustaX 1.8 unter Ausschluss von Lückenpositionen und Korrektur von multiplen Substitutionen durchgeführt (THOMPSON *et al.*, 1997). Das Maximum parsimony- und Maximum likelihood-Verfahren wurden mit den Programmen dnaml und dnapars des Phylip Programmpaketes durchgeführt (PHYLogeny Inference Package, FELSENSTEIN (1989), <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Die Graphische Darstellung der Stammbäume erfolgte mit dem Computerprogramm NJPlot (PERRIERE & GOUY, 1996).

2.21 Subpopulationsdifferenzierung mittels NEI -Koeffizient

Mit Hilfe des Softwareprogramms MEGA2 (molecular evolutionary genetics analysis software, KUMAR *et al.*, 2001) wurden die G_{ST} -Werte für die intra- und intergenetische Populationsdifferenzierung der untersuchten CLRV-Isolate auf der Grundlage der Sequenzen in Abhängigkeit von den natürlichen Wirtspflanzen, von den phylogenetischen Gruppen und vom Ursprungsland untersucht. NEI beschrieb 1987 eine Theorie, die es ermöglicht, die genetische Variation in Populationen abzuschätzen und zu quantifizieren. Hierbei wird analysiert, in welchem Verhältnis die genetischen Variationen innerhalb und zwischen den Subpopulationen zueinander stehen. NEI verwendet dazu den Parameter G_{ST} (coefficient of genetic differentiation), der den Anteil der genetischen Diversität der Gesamtpopulation im Verhältnis zur Diversität zwischen den Subpopulationen angibt und wie folgt definiert ist: $G_{ST} = D_{ST}/H_T$. H_T beschreibt die erwartete Heterozygotenrate (= genetische Diversität) der Gesamtpopulation, die sich aus der genetischen Diversität innerhalb der Subpopulationen (H_S) und der Diversität zwischen Subpopulationen (D_{ST}) zusammensetzt. Daher gilt: $H_T = H_S + D_{ST}$. Die Werte können sich im Bereich von 0 bis 1 bewegen. Ein G_{ST}

Wert von 0 bedeutet, dass die durchschnittliche genetische Diversität in einer betrachteten Subpopulation der durchschnittlichen genetischen Diversität der Gesamtpopulation entspricht, d. h. dass diese Subpopulation sich nicht durch eine geringere genetische Diversität im Vergleich zur Gesamtpopulation auszeichnet und die biologischen Kriterien zur Definition dieser Subpopulation sich nicht durch genetische Unterschiede im betrachteten Genbereich stützen lassen. Hohe G_{ST} -Werte zeigen, dass die zur Definition einer Subpopulation herangezogenen biologischen Kriterien mit genetischen Unterschieden und geringen genetischen Diversitäten innerhalb der Subpopulationen mit der durchschnittlichen genetischen Diversität der Gesamtpopulation korrelieren.

2.22 Korrelationsanalyse mittels Mantel-Test

Zur Analyse der Korrelation zwischen möglichen epidemiologisch relevanten Einflussfaktoren, wie der genetischen Distanz, den räumlichen Abständen der Untersuchungsstandorte und den verschiedenen Wirtspflanzen der untersuchten CLRV-Isolate, wurde der Mantel-Test (MANTEL, 1967) unter Verwendung des Programms XLSTAT durchgeführt (<http://www.xlstat.com>). Dieses Verfahren erfordert zunächst die Erstellung von Werte-Matrizen aus dem paarweisen Vergleich der Rohdaten für alle Isolate für jeden dieser Einflussfaktoren. Für den Vergleich dieser Daten ist eine lineare Regressionsanalyse ungeeignet, da die erstellten Vergleichs-Matrizen Gruppen von untereinander abhängigen Wertepaaren enthalten. Der Mantel-Test eignet sich hingegen zur Analyse, da er anstelle von Wertepaaren ganze Zeilen in der Matrix als eine Einheit betrachtet und verwendet. Zusätzlich wird im Mantel-Test eine Permutationsanalyse durchgeführt, die darauf beruht, dass eine der Matrizen konstant gehalten wird und durch wiederholten zufälligen Austausch ganzer Zeilen verschiedene Zufallsmatrizen erstellt und in die Analyse einbezogen werden. Die Signifikanz des Ergebnisses wird durch den Pseudo- R^2 -Wert ausgedrückt. Die geographischen Distanzen zwischen den Proben wurden anhand von Standortkoordinaten errechnet, die durch ein GPS (Global Positioning System) -Gerät, einem satellitengestützten Navigationssystem, ermittelt wurden. Die genetischen Distanzen zwischen den Proben wurden mit Hilfe des Programm ClustalX berechnet (2.20). Die Distanzen zwischen den Proben für die natürlichen Wirtspflanzenarten wurden als diskrete Werte gesetzt wobei der Wert ,0' beim Vorliegen identischer Original-Wirtspflanzenarten und der Wert ,1' beim Vorliegen unterschiedlicher Original-Wirtspflanzenarten der CLRV-Proben verwendet wurde.

2.23 Sekundärstrukturanalyse

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur verschiedener Nukleinsäuresequenzen der 3'UTR des CLRV wurden die Programme RNAfold, alidot, cmount, consensus, dpzoom und anote verwendet. Diese Programme sind ein Teil des Vienna RNA Package (HOFACKER, 2003) mit dem sich minimum free energy structures (mfe) nach dem Algorithmus von ZUKER & STIEGLER (1981) und Basenpaarwahrscheinlichkeiten nach dem Algorithmus von MCCASKILL (1990) zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen einzelner Sequenzen sowie Sekundärstrukturen von Konsensussequenzen aus dem Alignment einer Vielzahl von Sequenzen berechnen lassen. Der mfe-Algorithmus beruht auf der Annahme, dass RNA-Sekundärstrukturen *in vivo* zumeist die energetisch günstigste Konformität annehmen. Suboptimale Strukturen werden nicht berücksichtigt.

Ziel der RNA-Sekundärstrukturanalyse ist es, kompensatorische Mutationen ausfindig zu machen, um die Existenz von konservierten Basenpaarungen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorherzusagen, die die Vorhersage einer funktionellen Bedeutung durch den Erhalt einer Struktur unterstützt. Das Vorkommen konservierter Basenpaarungsstrukturen wird hierbei als Hinweis auf eine Funktionalität interpretiert, da trotz Mutationen einzelner Nukleotide während der Evolution die Struktur erhalten bleibt (kompensatorische Basenaustausche, HOFACKER *et al.*, 1998). RNAfold sortiert Basenpaarungen nach ihrer Glaubwürdigkeit und reduziert die Zahl der Einträge auf die konsistent vorhersagbaren Sekundärstrukturelemente. Man spricht dann von konsistenten Mutationen (consistent mutations), wenn verschiedene Standardkombinationen für ein spezielles Basenpaar vorgefunden werden. Als kompensatorische Mutationen gelten solche, bei denen beide Basen mutiert sind.

Zunächst wird mit dem Programm RNAfold eine Datei erstellt, die alle Sekundärstrukturen in einer Syntax beschreibt und die die mfe-Werte für alle gefalteten Sequenzen enthält. Anschließend können mit alidot konservierte Sekundärstrukturelemente berechnet werden. In der Ausgabedatei erhält man Informationen zur Anzahl der verschiedenen Basenpaarungstypen, die an einer bestimmten Stelle des Alignments vorkommen, zur Wahrscheinlichkeit einer solchen Basenpaarung und zu möglichen konservierten Bereichen der Sekundärstruktur in Klammernotation. Bei der Klammernotation bedeutet eine öffnende Klammer [(] zusammen mit einer schließenden Klammer [)] ein Basenpaar. Daher können sich öffnende und schließende Klammerpaare nicht überkreuzen. Diese stehen an der jeweiligen Stelle unter der Base. Ein Punkt [(.)] kennzeichnet eine nicht-gepaarte Base. Es können drei verschiedene Diagramme produziert werden, die die gleiche Information auf verschiedene Weise visuell verdeutlicht und so die Interpretation der Daten erleichtert (siehe

Ergebnisteil). Zunächst werden die Ergebnisse mit dem Programm alidot graphisch im Dot Plot dargestellt. Darauf aufbauend produziert das Programm cmount einen farbigen Hogeweg Mountain Plot zur besseren graphischen Anschaulichkeit. Für die nähere Betrachtung interessanter Sequenzbereiche kann mit dem Programm dpzoom ein Sequenzbereich herausgenommen und die erstellte Konsensussequenz und die Sekundärstruktur für die entsprechenden Basen mit dem Programm consensus berechnet werden.

In der traditionellen Darstellung der RNA-Sekundärstruktur sind kompensatorische Mutationen durch Kreise und inkonsistente Mutationen durch graue Basensymbole gekennzeichnet. Die farbliche Sättigung des Basensymbols charakterisiert, in wie vielen Sequenzen an dieser Stelle ein Basenpaar ausgebildet wird. Ein schwarzes Symbol bildet in jeder Sequenz eine Brücke, bei einem dunkelgrauen Symbol wird in einer Sequenz und bei einem hellgrauen Symbol in zwei Sequenzen kein Basenpaar ausgebildet.

Der Dot Plot stellt die mögliche Basenpaarung eines RNA-Strangs in einem Diagramm dar. Der Bereich unter der Diagonale stellt hierbei die Ergebnisse der Analyse in der Dreiecksmatrix ausschließlich für die Sekundärstrukturen dar, die durch die glaubwürdigsten Basenpaare gebildet werden. Der Bereich der Dreiecksmatrix oberhalb der Diagonale kennzeichnet die Analyse für vorhergesagte Basenpaare mit nicht mehr als 2 inkonsistenten Sequenzen. Jedes Basenpaar wird durch ein verschieden gefärbtes Quadrat visualisiert. Die Größe und Farbe eines Punktes dient als Richtschnur für die Bewertung des Basenpaares. Je größer ein Punkt ist, desto häufiger sind Basen an dieser Stelle in der Konsensussequenz gepaart. Die Farbe wird anhand der Anzahl unterschiedlicher Basenpaare zwischen den betrachteten Sequenzpositionen festgelegt. Grüne und im speziellen blaue Farben zeigen das Auftreten kompensatorischer Mutationen und sind daher das Auswahlkriterium zur Identifizierung von konservierten Bereichen mit potenziell funktioneller Bedeutung. Rot bedeutet identische Basen in allen Sequenzen (keine Sequenz-Variation). Daher kann an Hand dieser Basenpaarungen keine Aussage darüber getroffen werden, ob funktionell konservierte Strukturen vorliegen. Blasse Farben bedeuten, dass nicht-kompatible Mutationen vorliegen. Die gleichen Farbkodierungen werden im Mountain Plot verwendet. Die Farben bedeuten im Einzelnen:

- 1) rot: zwei gleiche Nukleotide
- 2) ocker: zwei verschiedene Basenpaarungen
- 3) grün: drei verschiedene Basenpaarungen
- 4) türkis: vier verschiedene Basenpaarungen
- 5) blau: fünf verschiedene Basenpaarungen
- 6) violett: sechs verschiedene Basenpaarungen.

Im Hogeweg Mountain Plot stellt die x-Achse die Basenposition dar und die y-Achse die Anzahl von Basenpaarungen, die an der jeweiligen Position aufgefunden wurden. Loops werden im Diagramm durch Plateaus beschrieben, gepaarte Bereiche durch positive und negative Steigungen. Je höher und breiter die Erhebung erscheint, desto länger ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der Konsensussequenz. Die farbigen Querbalken im Diagramm korrespondieren mit je einer Basenpaarung der Konsensussequenz, wobei wie im Dot Plot konstante Basenpaarungen in rot dargestellt sind, grün und blau stellen konservierte kompensatorische Mutationen dar, die die mögliche Bedeutung dieser Positionen zur Erhaltung einer Sekundärstruktur anzeigen.

2.24 Rekombinationsanalyse

Die Rekombinationsanalyse wurden mit dem Programm RDP-V2 Beta 08 durchgeführt (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>), das die Programme Recombination Detection Program (RDP; MARTIN & RYBICKI (2000)), Geneconv (PADIDAM *et al.*, 1999), MaxiChi (MAYNARD SMITH, 1992; POSADA & CRANDALL, 2001), Siscan (GIBBS *et al.*, 2000), Bootscan (SALMINEN *et al.*, 1995), Topal (MCGUIRE & WRIGHT, 1998; MCGUIRE & WRIGHT, 2000) und Chimaera (POSADA & CRANDALL, 2001) enthält. Die Untersuchungen wurden vergleichend mit allen sechs Programmen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von CLRV in Gehölzen und krautigen Pflanzen

In den Versuchsjahren 2001 bis 2004 wurden Blattproben von Gehölz- und Staudenarten mit unterschiedlichen Symptomausprägungen entnommen, die auf eine Infektion mit dem *Cherry leaf roll virus* (CLRV) hindeuteten oder in Nachbarschaft CLRV-infizierter Pflanzen standen, um eine Übersicht über die Verbreitung und die Symptomausprägungen bei verschiedenen CLRV-infizierten Pflanzenarten zu bekommen und verschiedene CLRV-Isolate für vergleichende Untersuchungen zu erhalten (Tab. A1 in Anhang).

Insgesamt wurden 106 Blattproben von 28 verschiedenen Gehölz- und Staudenarten von 36 verschiedenen Standorten in Deutschland, drei Standorten in Ungarn, drei Standorten in England, zwei Standorten in Neuseeland und einem Standort in den Niederlanden mittels IC-RT-PCR (2.9) auf eine Infektion mit dem CLRV getestet (Tab. 2). Neben den Proben von bekannten Wirtspflanzen des CLRV, wie Sand-Birke (*Betula pendula* Roth.), Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra* L.), Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior* L.), Faulbaum (*Rhamnus frangula* L.), Ulme (*Ulmus* sp.) und Himbeere (*Rubus idaeus* L.) wurden auch verschiedene Gehölze und Stauden getestet, die bislang noch nicht als Wirtspflanze des CLRV bekannt sind.

Es zeigte sich, dass CLRV in 31 der 106 gesammelten Proben (29 %) an 21 von 44 (21/44) untersuchten Standorten mittels IC-RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Tab. 5). Darüber hinaus wurden 22 Originalproben und 38 Isolate von verschiedenen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt (2.2). Davon wurden sieben Originalproben und 26 Isolate positiv auf eine CLRV-Infektion getestet (Tab. A2 im Anhang). Besonders häufig nachweisbar war CLRV in Holunder (19/27) und Sand-Birke (7/28). Insgesamt konnte CLRV durch dieses Verfahren in 17 verschiedenen Pflanzenarten der 14 Gattungen *Aegopodium*, *Betula*, *Carpinus*, *Cornus*, *Juglans*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Prunus*, *Rheum*, *Rubus*, *Sambucus*, *Sorbus*, *Ulmus* und *Vitis* nachgewiesen werden. Schwarz-Birke (*Betula nigra* L.), Hainbuche (*Carpinus betulus* L.), Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) und Gewöhnliche Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) wurden als neue Wirtspflanzenarten des CLRV identifiziert. Somit zeigt sich die Eignung der unter der Verwendung der Primer CLRV-RW1 und CLRV-RW2 eingesetzten IC-RT-PCR für den empfindlichen Nachweis des CLRV in Proben und Isolaten aus unterschiedlichsten Gehölzarten. In Abb. 1 wurden alle Standorte in Deutschland gekennzeichnet, an denen Probenahmen durchgeführt worden sind. Standorte, an denen CLRV-positives Pflanzenmaterial und verdeutlicht die deutschlandweite Verbreitung des CLRV.

Tab. 5: Zusammenstellung aller gesammelten Gehölz- und Staudenarten, die auf eine CLRV-Infektion untersucht wurden, unter Angabe des Jahres der Probenahme, der Standorte, der Anzahl der getesteten Pflanzen und der IC-RT-PCR-Testergebnisse.

Pflanzenart	Jahr der Probenahme	Anzahl der untersuchten Standorte	Untersuchte Standorte	Anzahl der getesteten Pflanzen	Anzahl der CLRV-infizierten Pflanzen
Sand-Birke (<i>Betula pendula</i>)	2001, 2002, 2003, 2004	17	Aachen, Aschersleben, Berlin-Neukölln, Berlin-Treptow, Berlin-Tempelhof, Berlin-Spandau, Berlin-Zehlendorf-1, Berlin-Zehlendorf-2, Berlin-Zehlendorf-3, Berlin-Zehlendorf-4, Budapest, Dresden, Fellinghausen, Klövensteen, Vaals, Lake Karapiro, Napier Bluff Hill	28	7
Schwarz-Birke (<i>Betula nigra</i>)	2003	1	Hannover-Herrenhausen	1	1
Wasser-Birke (<i>Betula occidentalis</i>)	2003	1	Hannover-Herrenhausen	1	0
Japan-Birke (<i>Betula platyphylla Japonica</i>)	2003	1	Hannover-Herrenhausen	1	0
Schwarzer Holunder (<i>Sambucus nigra</i>)	2001, 2002, 2003, 2004	20	Aschersleben, Balve, Berlin-Neukölln, Berlin-Zehlendorf-5, Berlin-Zehlendorf-6, Berlin-Zehlendorf-7, Dachau, Fellinghausen, Fischland, Gatersleben, Helgoland, Insel Poel, Kleinbeeren, Meisdorf, Neuruppin, Rellingen, Sümeg, Siófok, Werder, Wismar	27	19
Gemeine Esche (<i>Fraxinus excelsior</i>)	2002	6	Fellinghausen, Bad Salzflufen, Balve, Neuruppin, Dachau, Andechs	6	1
Hainbuche (<i>Carpinus betulus</i>)	2001	4	Niedereimer, Berlin-Neukölln, Fischland, Dachau	6	1
Eberesche (<i>Sorbus aucuparia</i>)	2000	4	Klövensteen	1	0
Giersch (<i>Aegopodium podagraria</i>)	2002, 2003	3	Berlin-Zehlendorf-4, Dachau, Fellinghausen	3	1
Himbeere (<i>Rubus idaeus</i>)	2002	1	Fellinghausen	2	0
Berg-Ahorn (<i>Acer pseudoplatanus</i>)	2002	1	Meisdorf	1	0
Flieder (<i>Syringa vulgaris</i>)	2002	1	Berlin-Neukölln	2	0
Flatterulme (<i>Ulmus laevis</i>)	2002	3	Berlin-Malchow, Meisdorf, Potsdam	5	0
Feld-Ulme (<i>Ulmus minor</i>)	2002	2	Berlin-Zehlendorf-3, Berlin-Zehlendorf-4	2	0
Efeu (<i>Hedera helix</i>)	2002	1	Aschersleben	1	0
Eingrifflicher Weißdorn (<i>Crataegus monogyna</i>)	2002	1	Balve	1	0
Faulbaum (<i>Rhamnus frangula</i>)	2002	3	Fellinghausen, Klövensteen, Neuruppin	3	0
Goldregen (<i>Laburnum anagyroides</i>)	2002	2	Berlin-Neukölln, Berlin-Zehlendorf-2	2	0
Haselnuss (<i>Corylus avellana</i>)	2003	1	Dachau	1	0
Rotbuche (<i>Fagus sylvatica</i>)	2001, 2002, 2003	4	Berlin-Neukölln, Dachau, Fellinghausen, Dachau	4	0
Wild-Apfel (<i>Malus</i> sp.)	2003	1	Balve	1	0
Roter Hartriegel (<i>Cornus sanguinea</i>)	2004	1	Kreuztal	1	0
Sommer-Linde (<i>Tilia platyphyllos</i>)	2002	1	Freiburg	1	0
Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>)	2003	1	Dachau	1	0
Hybrid-Forsythie (<i>Forsythia x intermedia</i>)	2003	1	Dachau	1	0
Chinesischer Blauregen (<i>Wisteria sinensis</i>)	2004	1	Berlin-Neukölln	1	0
Knoblauchrauke (<i>Alliaria petiolata</i>)	2004	1	Berlin-Zehlendorf-1	1	0
Rhabarber (<i>Rheum rhabarbarum</i>)	2004	1	Hamburg-Winterhude	1	1
Gesamt	2001-2004	44		106	31

Die aufgeführten deutschen Gehölznamen wurden der Gehölzflora (FITSCHEN, 1994) und die deutschen Staudennamen der Exkursionsflora von Deutschland (ROTHMALER, 1996) entnommen.

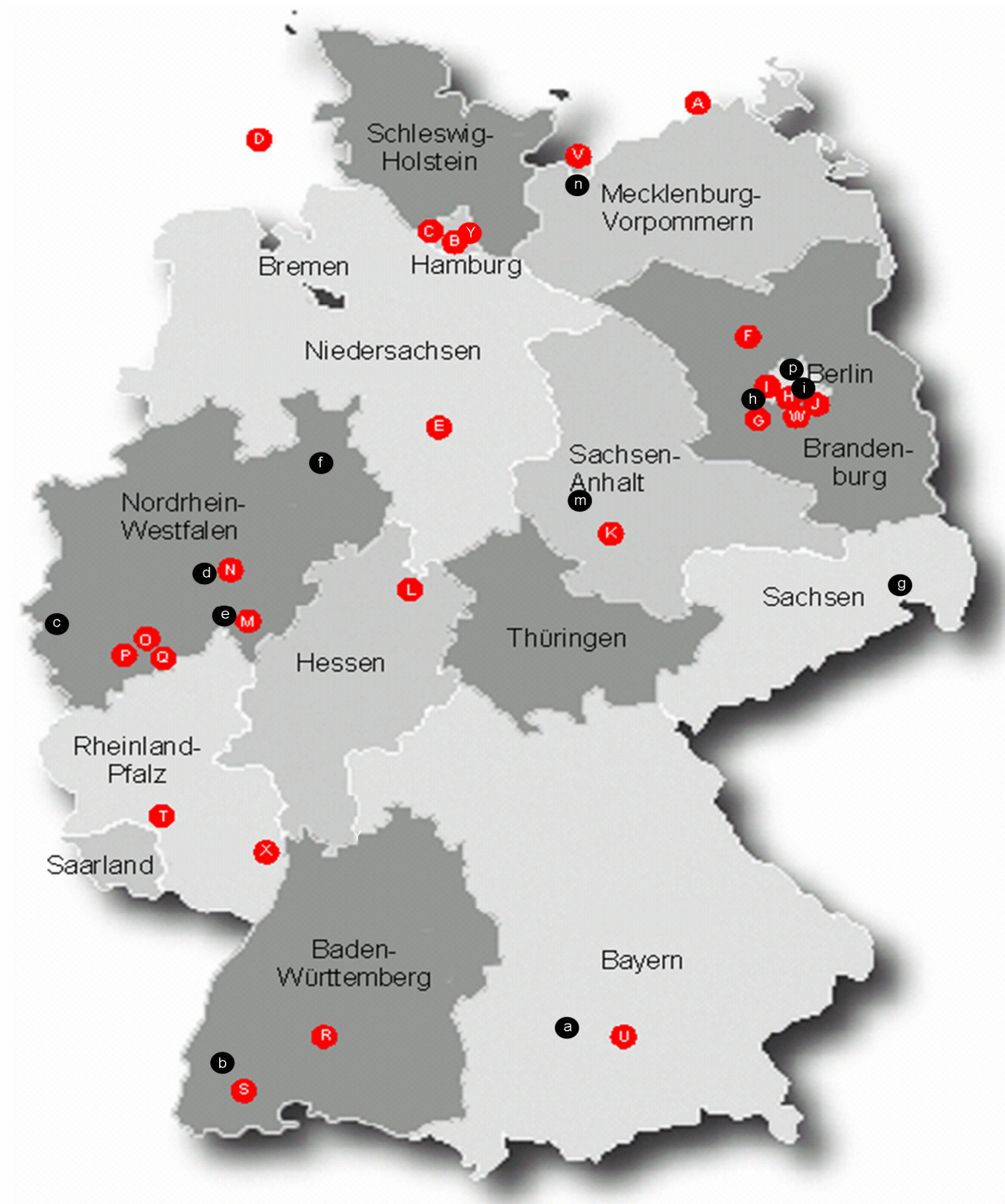


Abb. 1: Geographische Herkünfte aller Feldproben und CLRV-Isolate in Deutschland

● Rote Punkte: Untersuchungsstandorte, an denen CLRV-infizierte Pflanzen nachgewiesen werden konnten; ● schwarze Punkte: Untersuchungsstandorte, an denen keine CLRV-Infektion nachgewiesen werden konnte. A = Fischland; B = Hamburg-Osdorfer Born, C = Klövensteen, Rellingen, Pinneberg; D = Helgoland; E = Hannover-Herrenhausen; F = Neuruppin; G = Werder; H = Berlin-Zehlendorf-1 bis Berlin-Zehlendorf-7; I = Berlin-Rudow; J = Berlin-Ruhleben, K = Aschersleben; L = Kassel; M = Fellinghausen, Niedereimer; N = Balve; O = Bonn; P = Bornheim; Q = Siebengebirge; R = Schwäbische Alp; S = Neustadt-Titisee; T = Idar-Oberstein; U = Andechs; V = Insel Poel; W = Kleinbeeren; X = Neustadt/Weinstraße; Y = Hamburg-Winterhude; a = Dachau; b = Freiburg; c = Aachen; d = Meisdorf; e = Kreuztal; f = Bad Salzuflen; g = Dresden; h = Potsdam; i = Berlin-Treptow; m = Gatersleben; n = Wismar; p = Berlin-Malchow.

Insgesamt wurden 33 Standorte in Deutschland positiv auf eine CLRV-Infektion getestet, an 21 Standorten wurden positive CLRV-Proben, die für diese Arbeit gesammelt wurden, gefunden.

3.1.1 Nachweis von CLRV in Insekten

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Insektenübertragung des CLRV. Um potenzielle Insekten als Vektoren zu identifizieren, wurden Mitte Juni 2004 Klopfproben an der CLRV-infizierten Sandbirke in Berlin-Zehlendorf-6 (E896/E1745, Tab. A1 im Anhang) durchgeführt. Durch kräftiges Schütteln an den Ästen der Birke, wurden die Insekten herunter geschüttelt, mit einem Fangkorb eingefangen, anschließend bonitiert und nach dem Betäuben mit Aceton direkt für die IC-RT-PCR (2.11) eingesetzt. In die Bonituren wurden nur Insekten einbezogen, die als potenzielle Überträger in Frage kommen (keine Spinnen und Ameisen). Die Bonituren ergaben ein Artenspektrum von acht verschiedenen Insekten, darunter zwei Rüsselkäferarten (*Deporaus betulae*, *Polydrusus* sp.), drei nicht eindeutig klassifizierbare Zikadenarten, zwei Blattlausarten, darunter die grünliche Birkenzierlaus (*Euceraphis punctipennis* Zett), und die Birkenwanze *Kleidocerys resedae*. In bzw. an zwei von insgesamt acht Insektenarten wurde CLRV nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um eine Mischprobe von vier Individuen der Birkenwanzen *Kleidocerys resedae* (Abb. 2a) und einem Individuum einer Rüsselkäferart der Gattung *Polydrusus* sp. (Abb. 2b).

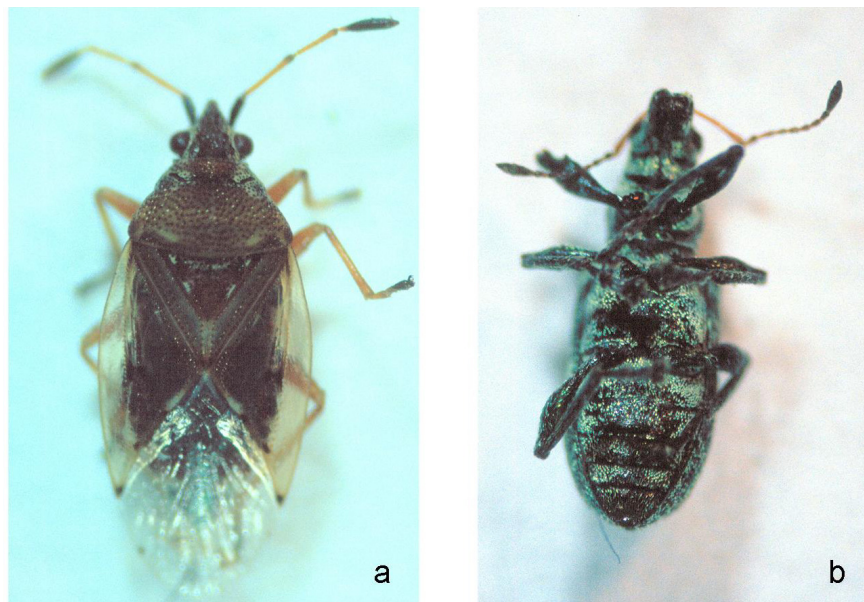


Abb. 2: Mittels IC-RT-PCR für CLRV positiv getestete Insektenarten

a. *Kleidocerys resedae*; b. *Polydrusus* sp.

3.2 Symptomausprägungen an CLRV-infizierten Gehölzen

Alle gesammelten Blattproben der 28 verschiedenen Gehölz- und Staudenarten wurden bonitiert und in weitere Untersuchungen einbezogen. Die beobachteten Symptomausprägungen variierten von chlorotischen Ringflecken über chlorotische Bänderungen und Scheckungen auf den Blättern der untersuchten Pflanzen bis hin zu abgestorbenen (nekrotischen) Pflanzenteilen. Bei den Probenahmen konnten besonders häufig die für eine CLRV-Infektion bereits in der Literatur beschriebenen Symptome an Sand-Birke und Schwarzem Holunder beobachtet werden (Abb. 3). Die Symptomausprägungen aller gesammelten Proben wurden in der Tab. A1 im Anhang aufgeführt. Die Abb. 3 zeigt typische Symptome von CLRV-infizierten Blättern von Sand-Birke (*Betula pendula* Roth. (a)) und Schwarzem Holunder (*Sambucus nigra* L. (b)), bei denen eine Infektion mittels IC-RT-PCR nachgewiesen wurde und sich anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen keine Hinweise auf einen weiteren viralen Erreger ergaben. Sand-Birken, die mittels Biotest, TEM oder IC-RT-PCR positiv auf eine CLRV-Infektion getestet wurden, zeigten ab Mai chlorotische Ringe und Linienmuster sowie verkleinerte, gewölbte Blätter und eine vorzeitige Seneszenz, so dass die symptomtragenden Blätter verfrüht vom Baum fielen. In den späten Sommermonaten waren dadurch keine Symptome an Blättern CLRV-infizierter Birken mehr sichtbar. An CLRV-infizierten Sand-Birken war zudem eine Verkahlung von einzelnen Astbereichen auffällig. Charakteristische Symptome an CLRV-infiziertem Schwarzen Holunder waren chlorotische Ringflecken und interkostale Gelbverfärbung, die schon zum Zeitpunkt des Austriebs auftraten und sich zunehmend verstärkten. Auf den Blättern einer CLRV-infizierten Hainbuche war die Symptomausprägung insgesamt wenig auffällig. Es zeigten sich nur schwach erkennbare Aufhellungen zwischen einzelnen Blattadern sowie leichte Wölbungen der Blätter in diesen Bereichen. In der Literatur wurde Hainbuche bisher nicht als Wirtspflanze des CLRV beschrieben. Eine Verbindung zwischen der nachgewiesenen CLRV-Infektion und chlorotischen Ringflecken auf den Blättern einer Gewöhnlichen Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) und Giersch (*Aegopodium podagraria* L.) ist fraglich, da mehrfach Pflanzen dieser Arten mit gleicher Symptomausprägung bei Testung auf CLRV-Infektion mittels IC-RT-PCR (2.10) negativ reagierten. Auch diese beiden Gehölzarten wurden bislang in der Literatur nicht als Wirtspflanze des CLRV beschrieben.

Es zeigte sich, dass die eindeutige Erkennung einer CLRV-Infektion allein anhand der Symptomausprägungen der Blätter der untersuchten Pflanzen nicht möglich ist. Einige Beispielbilder von Gehölzen mit virusverdächtigen Symptomen, die z. T. negativ auf eine Infektion mit CLRV mittels IC-RT-PCR getestet wurden, wurden in der Abb. A1 im Anhang

dargestellt. Auch erwiesen sich Blätter von Birke und Holunder mit den in der Literatur beschriebenen Symptomen im IC-RT-PCR-Nachweistest (2.10) als CLRV-negativ. Weiterhin zeigten die transmissions-elektronischen Untersuchungen (3.4), dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen CLRV-infizierten Gehölze vielfach mischinfiziert waren (3.4), so dass sich die Symptomausprägungen nicht zwingend auf die Infektion mit dem CLRV zurückführen lassen.

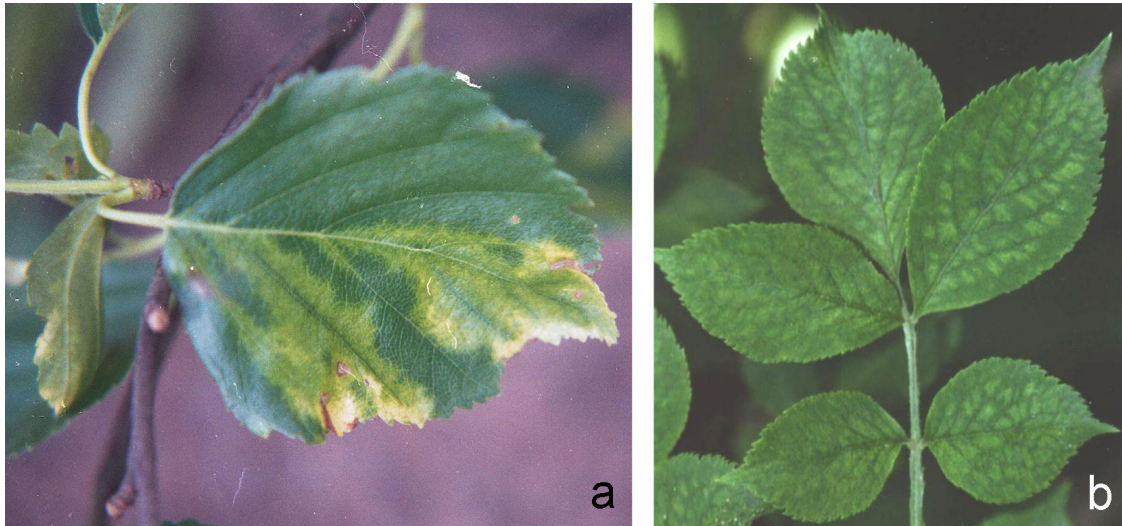


Abb. 3: Typische Symptomausprägungen auf Blättern CLRV-infizierter Gehölze.

a. *Betula pendula* (E135): chlorotische Bänderungen entlang der Blattadern, b. *Sambucus nigra* (E1682): chlorotische Ringflecken und Interkostal-Chlorosen

3.3 Symptomausprägungen an Indikatorpflanzen

Von 106 gesammelten Blättern mit Symptomen an holzigen und krautigen Pflanzen (2.1) wurden 86 mechanisch auf *Chenopodium quinoa* (2.7) inokuliert (Tab. A1 im Anhang). Eine mechanische Übertragung des CLRV war nur bei 14 von 25 mittels IC-RT-PCR positiv getesteten CLRV-Proben (3.1) erfolgreich. Es wurde generell beobachtet, dass sich die frischen Blattproben von Gehölzen leichter übertragen lassen, als bei -20 °C bzw. -80 °C tiefgefrorenes oder über CaCl_2 getrocknetes Blattmaterial. Ferner zeigten sich nach der ersten mechanischen Übertragung der mittels IC-RT-PCR positiv für CLRV getesteten Gehölze auf *C. quinoa* zum Teil keine Virus-Symptome. Durch mehrmaliges Übertragen von Testpflanze zu Testpflanze konnte die Viruskonzentration erhöht und die Symptomausprägung gefördert werden. Am erfolgreichsten war die Übertragung von CLRV-infizierten Schwarzen Holunderproben auf *C. quinoa* (80 %, 12/15). Dem gegenüber steht der geringe Übertragungserfolg von CLRV-infizierten Sand-Birkenproben auf *C. quinoa* von 29 % (2/7).

Zum biologischen Vergleich wurden die gewonnenen CLRV-Isolate auf verschiedene Testpflanzen der Gattungen *Chenopodium* und *Nicotiana* übertragen (2.7) und die Symptomausprägung, Inkubationszeit und der Krankheitsverlauf visuell bonitiert. Die

Symptomausprägung auf CLRV-infizierten *Chenopodium*-Pflanzen verlief bei allen Isolaten sehr ähnlich und führte ausgehend von den inokulierten Blättern zur systemischen Infektion der gesamten Pflanze. Die inokulierten Blätter zeigten deutliche chlorotische Lokalläsionen und die Folgeblätter wurden vom Blattstiel her flächig chlorotisch. Im Krankheitsverlauf überzog die Chlorose langsam das ganze Blatt (Abb. 4). Durch Übertragungsreihen von Testpflanze zu Testpflanze verstärkten sich die Symptome. Es entwickelte sich eine Spitzennekrose, die das weitere Wachstum der Pflanze verhinderte. Die Pflanze starb ab. Die Latenzzeit bis zum sichtbar werden der Symptome schwankte zwischen 3 und 5 Tagen. Auch auf Tabakpflanzen (*Nicotiana* sp.) war die Symptomausprägung der verschiedenen Isolate stets systemisch. Auf den inokulierten Blättern zeigten sich die für eine CLRV-Infektion typischen chlorotischen Ringflecken, die im Verlauf der Krankheit zunehmend nekrotisierten. Auf den Folgeblättern waren in den Winkeln der Blattadern meist kleine chlorotische Aufhellungen zu beobachten. Ab der dritten Woche erholten sich die Pflanzen jedoch wieder, die symptomtragenden Blätter fielen ab und es kam zu keiner erneuten Symptomausprägung auf den nachwachsenden Blättern. Die Latenzzeit bis zum sichtbar werden der Symptome lag im Durchschnitt bei 6 Tagen.

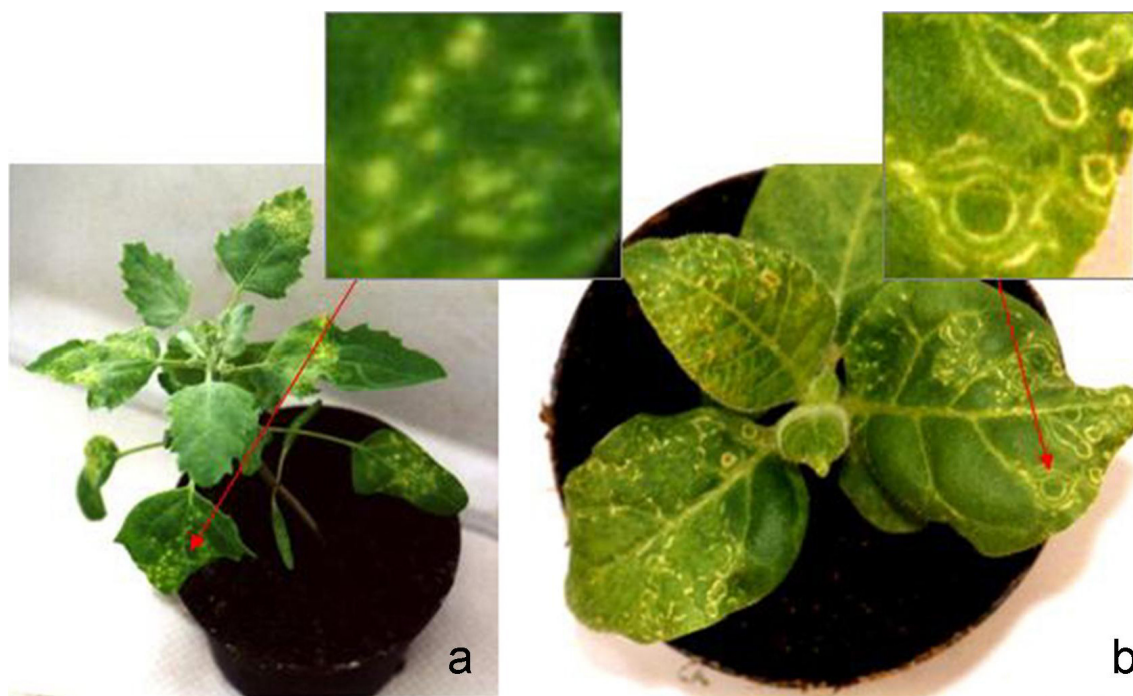


Abb. 4: Symptomausprägung auf CLRV-infizierten Indikatorpflanzen.

a. *Chenopodium quinoa* (E576, Schwarzer Holunder-Isolat aus Fellinghausen): chlorotische Lokalläsionen auf den inokulierten Blättern, flächige Chlorose auf den Folgeblättern. b. *Nicotiana tabacum* 'Samsun' (E120, Sand-Birken-Isolat aus Berlin-Spandau). Ungleichmäßige nekrotische Ringflecken, zum Teil mit einem zweiten Ring, der den ersten umschließt.

3.4 Elektronenmikroskopische Identifizierung von CLRV-Partikel

Insgesamt wurden 63 von den 106 gesammelten Blattproben mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) auf eine Infektion mit dem *Cherry leaf roll virus* untersucht (2.9), um Hinweise auf mögliche Virus-Mischinfektionen zu erhalten. CLRV-Partikel besitzen eine polyedrische Form und einem Durchmesser von ca. 30 nm bei Kontrastierung mit Uranylacetat. Die in Abb. 5a dargestellten CLRV-Partikel wurden bei 80.000facher Vergrößerung und 60 KeV mit Hilfe des Zeiss C10 Transmissionselektronenmikroskops fotografiert. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind im Anhang in der Tab. A1 detailliert aufgelistet. Von 22 nachweislich CLRV-infizierten Proben, die mittels TEM untersucht wurden (Tab. A1 im Anhang), konnten nur in 10 Präparaten (45 %) Partikel der zu erwartenden Größe und Form dargestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten nach erfolgreicher mechanischer Übertragung im Pflanzenhomogenat aller virusinfizierter Blattproben Viruspartikel nachgewiesen werden. Mit der Verstärkung der Symptomausprägung zeigte sich im Absorptionspräparat auch eine größere Anzahl von Viruspartikeln. Somit ist dieses Verfahren zur Kontrolle einer Virusinfektion in Testpflanzen geeignet.

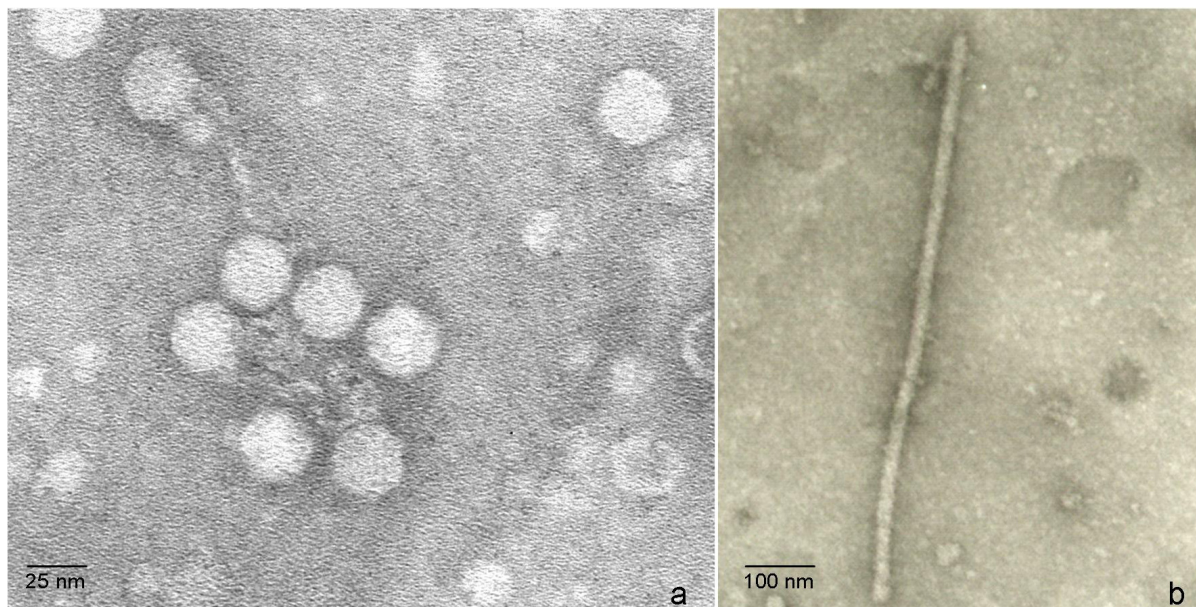


Abb. 5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Blatthomogenaten CLRV-infizierter Pflanzen

a) CLRV-Aufreinigung: CLRV-Holunder-Werder-Isolat (E603), polyedrische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm, b) *Sambucus nigra*: CLRV-Holunder-Helgoland-Isolat (E676), flexible filamentöse Viruspartikel

Das untersuchte Blattmaterial und die CLRV-infizierten Testpflanzen wurden zur Überprüfung von Mischinfektionen bzw. Kontaminationen mit Hilfe von Adsorptionspräparaten regelmäßig im TEM überprüft. In 8 von 22 untersuchten CLRV-infizierten Proben (36 %) konnte eine Mischinfektion von CLRV mit morphologisch anderen Viren festgestellt werden. Besonders häufig wurde eine Mischinfektion mit flexiblen filamentösen Partikeln von 300 nm bis 800 nm Länge in CLRV-infizierten Holunderproben beobachtet (88 %, 7/8, Abb. 5b). Die mittels TEM nachgewiesenen mischinfizierten Proben wurden auf *C. quinoa* mechanisch übertragen und anschließend nochmals transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass nach der Übertragung nur isometrische Partikel im TEM nachgewiesen werden konnten.

3.5 CLRV-Aufreinigung des Holunder-Isolats E603

Es wurde ein aufgereinigtes Viruspräparat zur Produktion eines polyklonalen Antiserums für ein CLRV-Holunder-Isolat hergestellt. Dieses sollte zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums für diagnostische Zwecke und vergleichende Isolat-Charakterisierung eingesetzt werden. Außerdem sollte es der Aufreinigung von genomischer Virus-RNA und zur Klonierung und Sequenzanalyse von RNA2 dienen (3.13). Die CLRV-Aufreinigung des Schwarzen Holunder-Isolats E603 aus Werder (Brandenburg) aus 500 g Blattmaterial von infizierten *Chenopodium quinoa*-Testpflanzen (2.8) ergab eine Konzentration der Virussuspension von 237,25 ng/μl. Insgesamt konnten 4,27 μg Virus gewonnen werden (in 1800 μl). Mit OD-Werten von $OD_{260/230} = 0,95$ und $OD_{260/280} = 1,87$ war der Reinheitsgrad der Virussuspension ausreichend für weitere Untersuchungen. Zusätzlich wurde die gereinigte Virussuspension im TEM auf ihre Verunreinigung mit Organellen und anderen pflanzlichen Zellbestandteilen kontrolliert. Dabei wurde festgestellt, dass die Aufreinigung nicht frei von Pflanzenrückständen ist, die Aufkonzentrierung des Virus aber erfolgreich war (3.4, Abb. 5a).

3.6 Etablierung einer IC-RT-PCR zur Testung großer Probenmengen

Da die genauen Ursachen für die weltweite und in Deutschland flächendeckende Verbreitung des CLRV noch nicht geklärt sind und Übertragungsversuche im Freiland angestrebt werden, die einen hohen Probenumsatz erfordern, wurde eine IC-RT-PCR entwickelt (2.10.5), die die Durchführbarkeit großer Probenmengen gewährleistet. Zur Optimierung der PCR für das PCR-Gerät Robocycler Gradient 96 (Stratagene) wurde die Effizienz der Amplifizierung bei Anwendung verschiedener $MgCl_2$ -Konzentrationen und Primeranlagerungs-Temperaturen unter Einsatz von rekombinanter Plasmid-DNA und verschiedener Verdünnungen des aufgereinigten CLRV-Präparats E603 (3.5) getestet. Es wurde mit 0,2 ml Multiply®-Pro Gefäßen (Sarstedt) gearbeitet.

Zur Optimierung der MgCl_2 -Konzentration für die in Kapitel 2.10.5 beschriebenen IC-RT-PCR wurden MgCl_2 -Konzentrationen von 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM und 3 mM für die PCR eingesetzt und bei Primeranlagerungs-Temperaturen von 45 °C, 51 °C, 55 °C, 59 °C, 63 °C und 67 °C getestet. Die PCR-Bedingungen sind unter 2.10.5 aufgeführt. Als Probe wurde 0,3 µg Plasmid-DNA des Isolats E395 verwendet, die das 420 bp lange Insert der 3'UTR enthält. In Abb. 6 wird das Ergebnis der Testreihe der 30 verschiedenen Varianten dargestellt. Es wurde die Variante mit einer Primeranlagerungs-Temperatur von 45 °C und einer MgCl_2 -Konzentration von 2 mM zur weiteren Optimierung unter praxisnäheren Bedingungen mit Viruspartikel ausgewählt, da das PCR-Produkt dieser Variante hohe DNA-Mengen des gewünschten Fragments und wenig unerwünschte Beiprodukte bei Verwendung aufgereinigter rekombinanter Plasmid-DNA aufwies (Abb. 6, roter Pfeil).

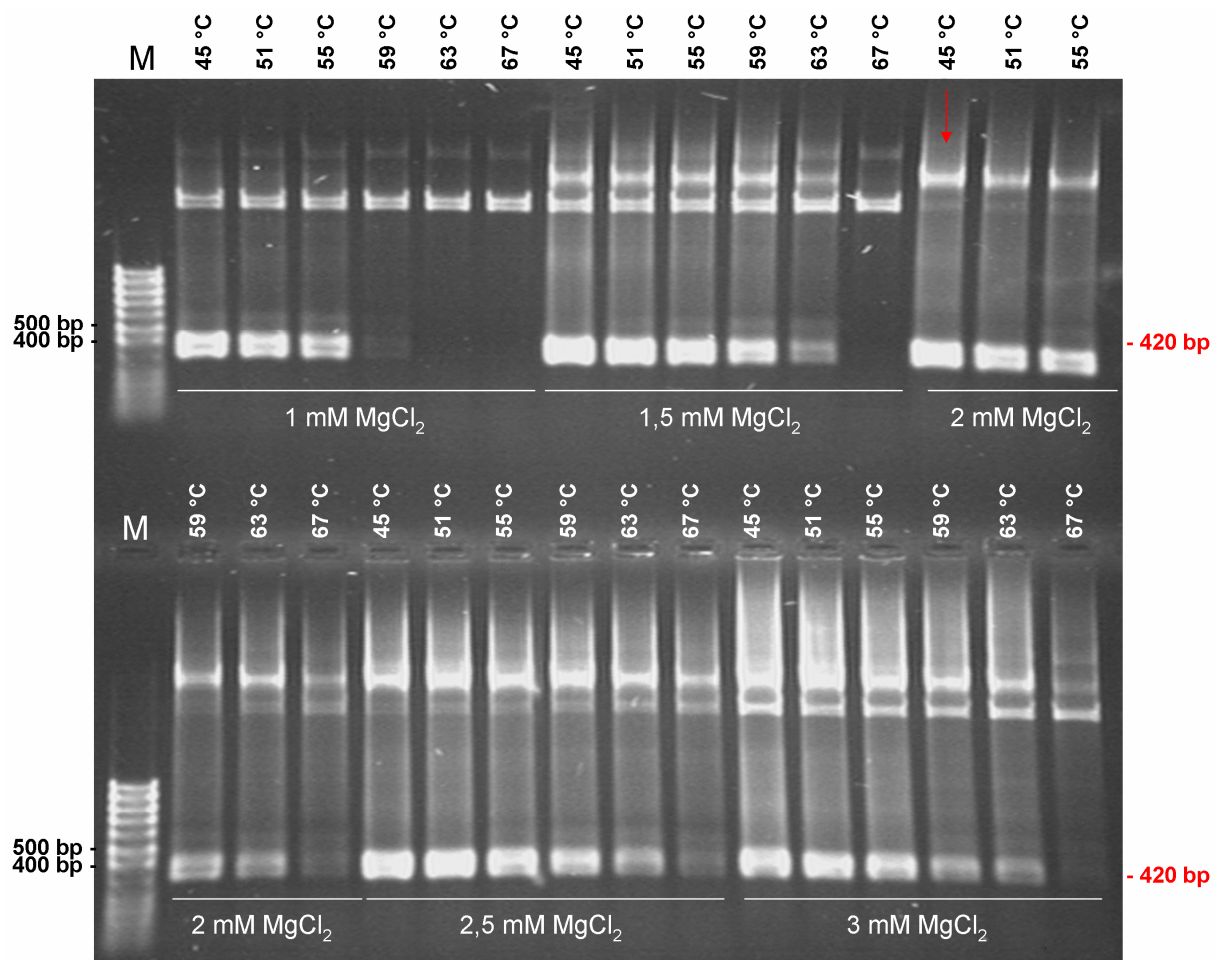


Abb. 6: PCR-Testreihe mit verschiedenen Primeranlagerungs-Temperaturen und MgCl_2 -Konzentrationen zur Optimierung der PCR-Bedingungen.

M (Marker): 50 bp DNA Ladder (^{MBI}Fermentas), Probe: Plasmid-DNA mit einem 420 bp langen Fragment der 3'UTR des CLRV-Isolats E395 (IC-RT-PCR (2.10), Klonierung (2.16))

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde mit Hilfe der aufgereinigten CLRV-Partikel (3.5) Verdünnungsreihen hergestellt und in der IC-RT-PCR eingesetzt. Die Viruskonzentration der Ausgangslösung lag bei 0,237 µg/µl. Verdünnt wurde in Probenpuffer (2.10.2). Folgende Viruskonzentrationen wurden für die IC-RT-PCR eingesetzt: 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl 10 fg/µl und 1 fg/µl. Die Proben wurden in 50 µl Einheiten aliquotiert und für kurze Zeit bei 4 °C oder über einen langen Zeitraum bei -20 °C gelagert. Im Test zeigte sich eine Nachweisgrenze von 1 pg/µl (Abb. 7). Die gleiche Verdünnungsreihe wurde zusätzlich direkt für die RT-PCR eingesetzt. Die Nachweisgrenze erhöhte sich dabei um eine 10er Potenz auf 100 fg/µl. Sowohl die RT-PCR als auch die IC-RT-PCR weisen somit bei der Verwendung aufgereinigter Viruspräparate verdünnt in ELISA-Beschichtungspuffer eine hohe Empfindlichkeit auf.

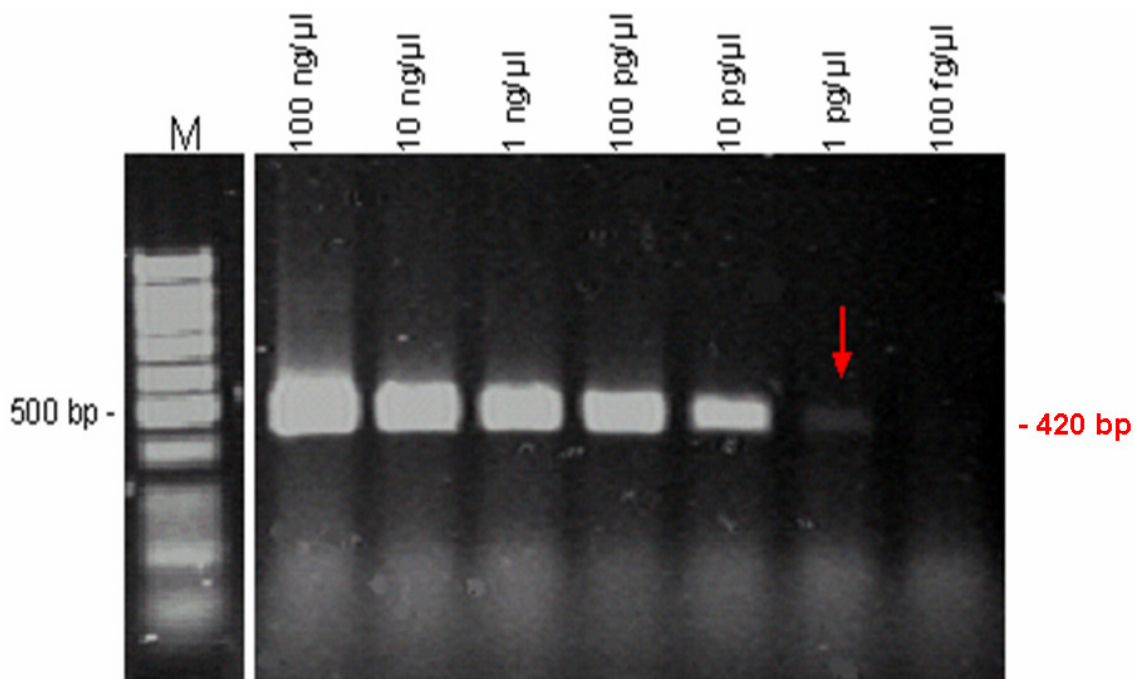


Abb. 7: PCR-Produkte der CLRV-Verdünnungsreihe im 1 %igen Agarose-Gel zur Bestimmung der Nachweisgrenze der optimierten IC-RT-PCR zum Massen-Screening.

M (Marker): 50 bp DNA Ladder (^{MBI}Fermentas); Probe: aufgereinigte Viruspartikel des Holunder-Isolats E603

Für alle folgenden Optimierungsschritte wurde demnach mit einer MgCl₂-Konzentration von 2 mM und einer Primeranlagerungs-Temperatur von 45 °C gearbeitet. Zum Vergleich der Reaktionsgefäße wurden zwei 96-Loch-PCR-Platten (M_BP (*Molecular Bio Products*) und Braun) sowie zu Achter-Ketten verbundene 0,2 ml-Gefäße (8-strips, Stratagene), in der IC-RT-PCR eingesetzt. Um zu testen, ob sich diese mit aufgereinigten Material optimierten PCR-Verfahren auch zum CLRV-Nachweis unter praxisnahen Bedingungen mit Feldmaterial

einsetzen lassen, wurden verschiedene Verdünnungsstufen der CLRV-Aufreinigung sowie CLRV-Infizierten Blatthomogenate von *Chenopodium quinoa* und *Sambucus nigra* im Vergleich getestet. Als Negativkontrolle wurde Wasser und Blatthomogenate von virusfreien *C. quinoa* und *S. nigra* eingesetzt. Im Vergleich zeigten sich die 0,2 ml-Gefäße (8-strips, Stratagene) als am besten geeignet. Sowohl die Nachweisgrenze der Verdünnungsreihe als auch die Nachweisempfindlichkeit bei der Testung von CLRV-infiziertem Blattmaterial und Negativkontrollen unterschied sich nicht von den 0,2 ml Multiply[®]-Pro Gefäßen (Sarstedt), die bislang in die IC-RT-PCR eingesetzt wurden. Bei der Durchführung mit den 96-Loch-PCR-Platten von M_BP traten zwar sehr starke, aber vielfach auch unspezifische Banden auf, so dass eine sichere Auswertung erschwert wurde. Bei der Durchführung der IC-RT-PCR mit den 96-Loch-PCR-Platten von Braun waren alle Proben negativ. Daher sind die 8er-Strips der Firma Stratagene im Vergleich zu den 96-Loch-PCR-Platten am besten für diese IC-RT-PCR im Robocycler Gradient 96 (Stratagene) geeignet. Es zeigte sich bei den Testungen, dass alle in die IC-RT-PCR eingesetzten Negativ-Kontrollen eindeutig negativ und alle Positiv-Kontrollen, unabhängig vom eingesetzten Pflanzenmaterial, eindeutig positiv waren. Somit wurde ein PCR-Verfahren entwickelt, dass den Einsatz großer Probenmengen ermöglicht und zudem einfach zu handhaben und äußerst sparsam in den Aufwandsmengen ist.

3.7 Längenpolymorphismus der 3'UTR von CLRV-Isolaten

Die mittels IC-RT-PCR (2.9) amplifizierten ca. 420 bp langen PCR-Produkte der 3'-terminalen Region des CLRV-Genoms aus verschiedenen Gehölzarten zeigten in ersten Untersuchungen leichte Unterschiede in der Fragmentlänge. Um dies zu verifizieren, wurden nochmals sieben Isolate von verschiedenen Gehölzarten ausgewählt, deren PCR-Produktmengen mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop ND-1000 aneinander angeglichen, in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und optisch miteinander verglichen.

Die Fragmente zeigten im optischen Vergleich leichte Größenunterschiede zueinander. Abb. 8 zeigt von den 73 CLRV-Sequenzen beispielhaft die sieben ausgewählten Isolate, deren DNA-Mengen auf 1 µg DNA pro Probe angeglichen wurden. Nach Klonierung (2.16) und Sequenzierung (2.19) dieser Isolate konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. So unterscheiden sich die DNA-Fragmente für die in Abb. 8 dargestellten Isolate um bis zu 12 Basen in der Gesamtlänge. Das Walnuss-Isolat besitzt hierbei mit 407 bp die kürzeste und das Rhabarber-Isolat mit 419 bp die längste Basenanzahl (siehe auch 3.10).

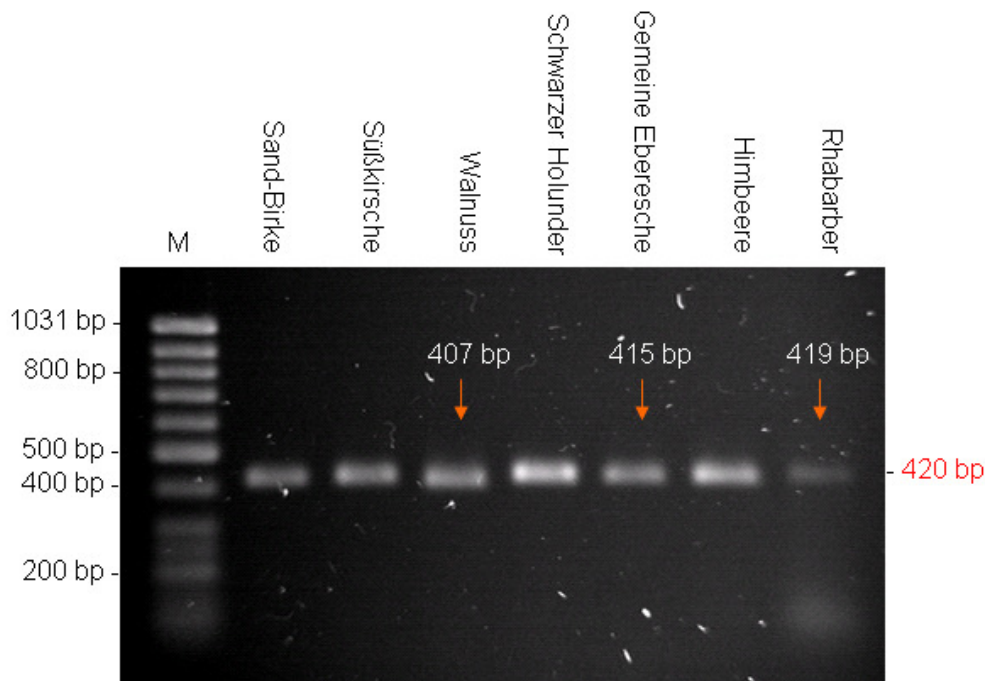


Abb. 8: Amplifikate der unter der Verwendung der Primer RW1 und RW2 durchgeführten IC-RT-PCR verschiedener CLRV-Isolate und Herkünfte nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarose-Gel.

M = Marker (Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, ^{MBI}Fermentas); 1 = Sand-Birke-Berlin-Spandau (E120), 2 = Süßkirsche-Bonn (E327), 3 = Walnuss-Oberkassel (E326), 4 = Schwarzer Holunder-Fischland/Darß (E485), 5 = Gemeine Eberesche-Neustadt/Titisee (E693), 6 = Himbeere-Neuseeland (E802), 7 = Rhabarber-Hamburg-Winterhude (E1771).

3.8 Genetische Variabilität der 3'UTR von CLRV-Isolaten

Die Größenunterschiede der IC-RT-PCR-Amplifikate verschiedener CLRV-Isolate (3.7), deuten auf genomische Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten in dem hochkonservierten nicht-kodierenden 3'-terminalen Bereich (3'UTR) des Virusgenoms hin. Unter der Annahme, dass sich die verwendeten PCR-Primer an beide genomischen RNAs anlagern können, ist es höchstwahrscheinlich, dass PCR-Produkte von beiden RNAs amplifiziert werden und die Sequenzunterschiede durch Sequenzierung nachgewiesen werden können. Es wurde daher zunächst untersucht, inwieweit sich die beiden unterschiedlichen Sequenzen der zwei genomischen RNAs unterscheiden. Ferner wurde untersucht, wie variabel die genomischen RNA-Populationen verschiedener CLRV-Isolate in diesem Bereich des Virusgenoms sind. Dadurch sollte eingeschätzt werden, ob die Sequenzierung einzelner Moleküle dieses Genombereichs eine Basenzusammensetzung widerspiegelt, die repräsentativ und spezifisch für diesen Genombereich zwischen verschiedenen CLRV-Isolaten ist oder ob dieser Genombereich eines Isolats aus einer Population von RNA-Molekülen besteht, die ein Gemisch aus variablen Molekülen unterschiedlicher Sequenzabfolgen darstellt (Quasispezies-Konzept; MORSE, 1993).

Um die genetische Variabilität innerhalb des Genombereiches einzelner CLRV-Isolate zu ermitteln, wurden das CLRV-Birken-Isolat aus Berlin-Spandau (E120) und das CLRV-Holunder-Isolat aus Berlin-Zehlendorf-1 (E119) ausgewählt, mittels IC-RT-PCR amplifizierte Einzelkopie-DNA-Fragmente in *E. coli* kloniert (2.16), die Plasmide aufgereinigt (2.17) und anschließend 4 Klone des Birken-Isolats und 6 Klone des Holunder-Isolats in beide Richtungen sequenziert (2.19). Hierzu wurden die durch die IC-RT-PCR gewonnenen CLRV-spezifischen Fragmente über QIAEX II-Minisäulen gereinigt (2.15). Die Auswertung der erhaltenen Nukleinsäuresequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme BioEdit 7.4 (2.19) und ClustalX 1.8 (2.20).

Es zeigte sich, dass alle zu einem Isolat gehörenden Klone identische oder fast identische Sequenzabfolgen (nicht mehr als 1 Nukleotid Unterschied) aufwiesen. Da die verwendeten PCR-Primer an beide genomischen RNAs des hochkonservierten 3'-terminalen CLRV-Genoms anlagern können, zeigt sich auch, dass in diesem Bereich die RNA1 und RNA2 identische Sequenzabfolgen aufweisen.

Zwischen den zwei Isolaten aus Birke und Holunder liegt hingegen eine Sequenzdiversität von 11 % vor. Die Sequenz des Birken-Isolats aus Berlin mit einer Gesamtlänge von 421 bp war im Vergleich zur Sequenz des CLRV-Holunder-Isolats mit einer Gesamtlänge von 417 bp um 4 bp länger (REBENSTORF, 2002). Die Tatsache, dass sich die Sequenzen zwischen verschiedenen CLRV-Isolaten im untersuchten Genomabschnitt unterscheiden, zeigt, dass die genetischen Unterschiede der untersuchten 3'-terminalen nicht-kodierenden Region (3'UTR) des CLRV isolatspezifisch sind und die RNA-Population eines CLRV-Isolates homogen ist. Die Sequenzierung der klonierten Teilbereiche der 3'UTR von zwei bzw. drei voneinander unabhängigen cDNA-Klonen weiterer 30 natürlich infizierten Blattproben bzw. CLRV-Isolaten, sequenziert in 5'-3'-Richtung und in 3'-5'-Richtung, wiesen 100 %ige Sequenzidentitäten auf und unterstützen das Ergebnis. Die Anzahl der getesteten Klone je Isolat wurde in Tab. A1 im Anhang detailliert aufgelistet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Sequenz eines Klon pro CLRV-Isolat innerhalb dieses Genomabschnitts prinzipiell zur Charakterisierung und phylogenetischen Analyse eignet.

3.9 Genetische Stabilität von CLRV-Isolaten bei Vermehrung in Indikatorpflanzen

In die phylogenetischen Sequenzanalyse der 3'UTR wurden CLRV-Isolate eingesetzt, die teilweise über Jahre im Gewächshaus auf Indikatorpflanzen übertragen worden sind. Die Übertragung und Vermehrung von Viren in Indikatorpflanzen beinhaltet jedoch potenzielle Probleme, da diese Mutationen akkumulieren und eine Veränderung ihres Genoms aufgrund der Anpassung an diese Indikatorpflanzen erfahren haben können. Um den Einfluss der Indikatorpflanzen auf die Stabilität des CLRV-Genoms abzuschätzen, wurden daher

Sequenzen verglichen, die aus vermehrten Isolaten und Original-Proben dergleichen Standorte und aus verschiedenen Jahren amplifiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Vermehrung der zur Vermehrung von CLRV-Isolaten verwendeten Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa* auch bei Vermehrung über mehr als 20 Jahre im Gewächshaus, Veränderungen des Genoms im 3'UTR-Bereich nicht häufig sind.

Tab. 6: Vergleich der Sequenzen der 3'UTR (380 bp) von CLRV-Isolaten (I) und Feldproben (O) nach wiederholter Vermehrung in der Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa*

Herkunft der Proben und Isolate	Vergleichenes Material, Anzahl der Übertragungen in <i>Chenopodium quinoa</i> ¹	Proben und Jahr der Konservierung ²	Anzahl der verglichenen Sequenzen	Sequenzdiversität der 3'UTR (380 bp)
Birken-Probe und Isolat, Klövensteen, Fachgebiet Phytomedizin	Originalprobe und 14 mal in <i>C. q.</i> vermehrtes Isolat	E696 (O) von 1995, E111 (I) von 1996	2	identisch
Birken-Isolat I₂, CEH Oxford	Mindestens 12 mal in <i>C. q.</i> vermehrtes Isolat (Details unbekannt)	E1469 (I) von 1991, E1470 (I) von 1992, S84124 von 1992 (SCOTT <i>et al.</i> , 1992), E1473 (I) von 1997	4	identisch
Kirschen-Isolat CH125, CEH Oxford	Mindestens 8 mal in <i>C. q.</i> vermehrtes Isolat (Details unbekannt)	E1460 (I) von 1980, E1472 (I) von 1993	2	identisch

¹alle Isolate wurden zur PCR und Sequenzierung ein weiteres Mal in *C. quinoa* vermehrt, ²die Konservierung der Proben erfolgte durch Einfrieren bei -20 °C oder Trocknung und Einschluss in Glasampullen.

3.10 Phylogenetische Analyse der 3'UTR des CLRV

Zur Ermittlung möglicher Verwandtschaftsverhältnisse wurde mit Hilfe von Sequenzdaten eine phylogenetische Analyse (2.20) von einem Teilbereich des 3-terminalen CLRV-Genoms für Proben und Isolate aus verschiedenen Wirtspflanzen und unterschiedlicher geographischer Herkunft durchgeführt. Da nachgewiesen werden konnte, dass CLRV in der untersuchten 3'UTR eine homogene Struktur besitzt und die Sequenzunterschiede isolatspezifisch sind (3.8), wurden lediglich zwei Sequenzen für jedes Isolat bestimmt und jeweils in beide Richtungen sequenziert.

Die phylogenetische Analyse umfasst Sequenzen für acht Proben, amplifiziert aus im Gewächshaus auf Testpflanzen vermehrten Virusisolaten (E120, E441, E443, E485, E568,

E576, E583, E603), und Sequenzen für 23 Proben, die direkt aus gesammelten CLRV-infizierten Feldproben amplifiziert wurden (Tab. A3 im Anhang). Außerdem wurden, ausgehend von 18 CLRV-Isolaten und acht Feldproben amplifizierte Sequenzen analysiert, die von verschiedenen Wirtspflanzen aus Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Neuseeland, Slowakei, Ungarn und den USA stammen, von Kollegen zur Verfügung gestellt und positiv auf eine CLRV-Infektion getestet wurden (Tab. A2 im Anhang). Zusätzlich wurden zwei Sequenzen, die bei Insekten-Testungen erhalten wurden (3.1.1), in die phylogenetische Analyse mit aufgenommen. Des Weiteren wurden zusätzlich zu diesen 59 ermittelten Sequenzen (Sequenzen von 26 Isolaten, 31 Feldproben und zwei Insekten), fünf CLRV-Sequenzen mit einbezogen (Walnuss-CTIFL, -GAY, -Ludmila, -4WJUG, Schwarzer Holunder-DSMZ-PV0276), die von Dr. Candresse (UMR GD2P, INRA et Université Bordeaux 2, IBVM, Villenave d'Ornon, Frankreich) im Rahmen einer Zusammenarbeit mittels IC-RT-PCR (2.10) amplifiziert und sequenziert (2.19) wurden sowie neun Sequenzen die in der Datenbank des European Bioinformatics Institute (EBI) erhältlich sind (EMBL-Nummern X99828, WERNER *et al.* (1997); S84124, S84125, S84126, SCOTT *et al.* (1992); Z34265, BORJA *et al.* (1995); CLU24694, BROOKS & BRUENING (1995b); AB168100, AB168099 und AB168098, YAMASHITA & FUKUI (2004), so dass insgesamt ein Datensatz von 73 Sequenzen analysiert wurde. Alle Daten, die auf in Datenbanken veröffentlichten Sequenzen beruhen, wurden mit dem vom EBI in der EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk>) verwendeten Code gekennzeichnet (Tab. A3 im Anhang).

In 67 von 73 Fällen gelang es, die vollständige Nukleotidzusammensetzung der ca. 420 bp langen Fragmente nach Amplifizierung mittels IC-RT-PCR (2.10) zu sequenzieren (2.19). Durch den Sequenzvergleich der 67 Sequenzen mit Hilfe des Programms ClustalX 1.8 (2.20) konnten sowohl Punktmutationen, d. h. durch Mutation einer Base entstandene einzelne unterschiedliche Basen, als auch „indel“-Variationen (Insertionen bzw. Deletionen) aufgedeckt werden (Abb. A3 im Anhang). Nach Eliminierung der Primersequenzen variierten die Sequenzbereiche in ihrer Länge zwischen 362 bp (E648, E326) und 380 bp (E156). Der paarweise Vergleich der Sequenzen mit dem Programm MEGA2 (2.21) zeigte eine durchschnittliche genetische Distanz von 9.5 % ($\pm 1,0$ %). Berücksichtigt werden muss hierbei, dass in diesen Durchschnittswert auch identische Sequenzen einbezogen wurden. Es gab acht Paare, die zwei oder mehr Isolaten umfassen, die zu 100 % identische Sequenzen aufwiesen (1. E800-4WJUG; 2. E676-E695-E678-E698-E575; 3. E111-E696; 4. E120-E836-E154, 5. E1469-S84124-S84125, 6. E1733-E896, 7. E805-E1472, 8. AB168100-AB168099-AB168098). Unter der Verwendung strikterer Regeln zur Zufallsprobenahme können möglicherweise höhere Werte für die durchschnittliche genetische Distanz erwartet werden. Von den aus verschiedenen Jahren stammenden amplifizierten Sequenzen der Isolate Birke-I₂ und Süßkirsche-CH125 wurde jeweils nur eine

Sequenz im Stammbaum aufgenommen, da auch diese in der Basenzusammensetzung zu 100 % identisch waren (3.9).

Die Sequenzen aller 73 positiv getesteten Proben erstreckte sich nach dem Angleichen der Sequenzen in der Sequenzlänge auf ein ca. 280 bp langes DNA-Fragment. Die 280 bp langen Sequenzen stellen somit einen Ausschnitt aus der 380 bp langen Sequenz des jeweiligen Isolats dar. Beim Vergleich der Länge aller 73 Nukleinsäuresequenzen unterscheiden sich die Sequenzen um maximal 13 Basen und liegen zwischen 273 bp und 286 bp. Die durchschnittliche genetische Distanz für 73 Proben liegt, wie beim Vergleich der gesamten 380 bp für 67 Proben, bei 9,5 % ($\pm 1,1$ %).

Um zu überprüfen, inwieweit sich die phylogenetische Analyse zwischen den 380 bp langen Sequenzen und den 280 bp langen Sequenzen unterscheidet, wurden die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der gleichen 67 Sequenzen der beiden unterschiedlichen Längen miteinander verglichen (Abb. A2 im Anhang). Der direkte Vergleich zeigt, dass die Stammbäume sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden und insbesondere die Gruppenzuordnung identisch bleibt. Daher wird ausschließlich der phylogenetische Vergleich der Nukleinsäuresequenzen aller 73 Sequenzen der 3'UTR (280 bp) der verschiedenen CLRV-Isolate aus unterschiedlichen Wirtspflanzen und Herkunft in Abb. 9 dargestellt.

Der phylogenetische Stammbaum der 73 CLRV-Sequenzen (280 bp), erstellt mit den Programmen ClustalX 1.8 und NJPlot (2.20), zeigt eine Aufspaltung der Isolate in verschiedene Gruppen. Diese werden durch hohe bootstrap-Werte von zumeist 95 % oder mehr (Münchhausen-Methode, Felsenstein, 1985), die die Wahrscheinlichkeit der statistischen Aussage und Stichprobenfehler anzeigen, verifiziert. Sieben phylogenetische Hauptgruppen konnten unterschieden werden. Einige von ihnen umfassen eine große Zahl von Proben, die vom gleichen natürlichen Wirt stammen und die in Abb. 9 verwendeten Gruppenbezeichnungen begründen: Die Walnuss-Gruppe [D] umfasst 10 Proben, amplifiziert ausschließlich aus infizierten Walnusspflanzen, die Holunder-Gruppe [E] umfasst 18 Proben, amplifiziert aus Schwarzem Holunder und jeweils einer Probe aus Hainbuche, Eberesche und Kanadischem Holunder. Die Süßkirschen-Birkengruppe [A] weist demgegenüber eine größere Zahl an natürlichen Wirtspflanzenarten auf (13 Proben wurden aus Sand-Birke amplifiziert, drei aus Süßkirsche, je eine aus Schwarz-Birke, Petunie, Brombeere, Weinrebe, Rhabarber, Walnuss, Schwarzem Holunder, Rotbuche, Gemeiner Esche und zwei aus Insekten (3.1.1), die von Sand-Birken gesammelt wurden und CLRV-infiziert waren). Die Himbeer-Gruppe [C] und die Rhabarber-Gruppe [B] weisen ebenfalls eine größere Bandbreite an Sequenzen von verschiedenen natürlichen Wirtspflanzenarten auf. Die Hartriegel-Gruppe [G] und die Ulmen-Gruppe [F] bestehen hingegen nur aus einem einzigen

Isolat. Basierend auf dem hohen bootstrap-Wert von 99 %, kann die Walnussgruppe in zwei Untergruppen unterteilt werden ([D2] Walnuss-Ost und [D1] Walnuss-West). Die Datenanalysen und die phylogenetischen Stammbäume der drei Methoden neighbour joining, minimum evolution und maximum parsimony (2.20) erbrachten im Wesentlichen ähnliche Gruppierungen, daher wurde nur der Stammbaum der neighbour joining-Methode gezeigt (Abb. 9).

Mit dem Programm ClustalX 1.8 (2.20) unter Ausschluss von Lückenpositionen und Korrektur von multiplen Substitutionen wurden die Sequenzdiversitäten zwischen den phylogenetischen Gruppen A bis E aus Abb. 9 (Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten) und innerhalb der Gruppen (Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten) des CLRV der 380 bp und 280 bp langen Sequenzen berechnet. Da sich die Prozentwerte der genetischen Distanzen nur unwesentlich (um 0 % bis 2 %) und die Gruppenzugehörigkeiten der Isolate gar nicht unterscheiden, werden in Tab. 7 nur die Ergebnisse für die 280 bp lange Sequenz gezeigt. Die Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten liegen dabei zwischen 0 % und 11,1 % und die Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten zwischen 4,4 % und 16,4 %. Innerhalb der Holundergruppe besteht die größte genetische Distanz von 11,1 %. Die Unterschiede innerhalb der Walnuss-Gruppe liegen bei 0,4 % bis 7,7 % und ähneln den durchschnittlichen genetischen Distanzen der Süßkirschen- und der Rhabarber-Gruppe mit Werten von bis zu 6,9 % bzw. 6,1 %. Auffallend ist hierbei, dass trotz der hohen Anzahl an unterschiedlichen Wirtspflanzen innerhalb der Süßkirschen-Gruppe, die durchschnittliche genetische Variabilität relativ gering ausfällt. Die geringste Variabilität innerhalb einer Gruppe weist die Himbeer-Gruppe mit nur 0 % bis 0,7 % auf. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für diese Gruppe auch nur vier Sequenzen vorlagen. Eine maximale Abweichung von 16,4 % wurde zwischen den Proben Schwarzer Holunder-Werder (E603) und Sand-Birke-Berlin-Thielallee (E896 bzw. E1733) festgestellt. Auffällig ist auch, dass die prozentualen genetischen Unterschiede innerhalb der Gruppen insgesamt wesentlich niedriger sind, als zwischen den verschiedenen Gruppen. So liegen die Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten im Durchschnitt zwischen $0,4 \% \pm 0,3$ und $5,8 \% \pm 0,8$ und die Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten zwischen $5,3 \% \pm 1,2$ und $14,4 \% \pm 2,1$. Dies bestätigt zusätzlich die phylogenetischen Gruppenzuordnungen der Mitglieder.

Die phylogenetische Analyse der CLRV-Sequenzen der beiden Insekten-Isolate zeigte für die Rüsselkäfer-Probe eine 100 %ige Übereinstimmung mit der Sequenz der CLRV-Probe E896 der Sand-Birke, von der die Rüsselkäfer gesammelt wurden. Die Birkenwanze, die vom gleichen Baum zur gleichen Zeit stammt, zeigte hingegen, mit einer Sequenzdiversität von 1,6 %, eine größere Sequenzübereinstimmung zu dem Isolat E111.

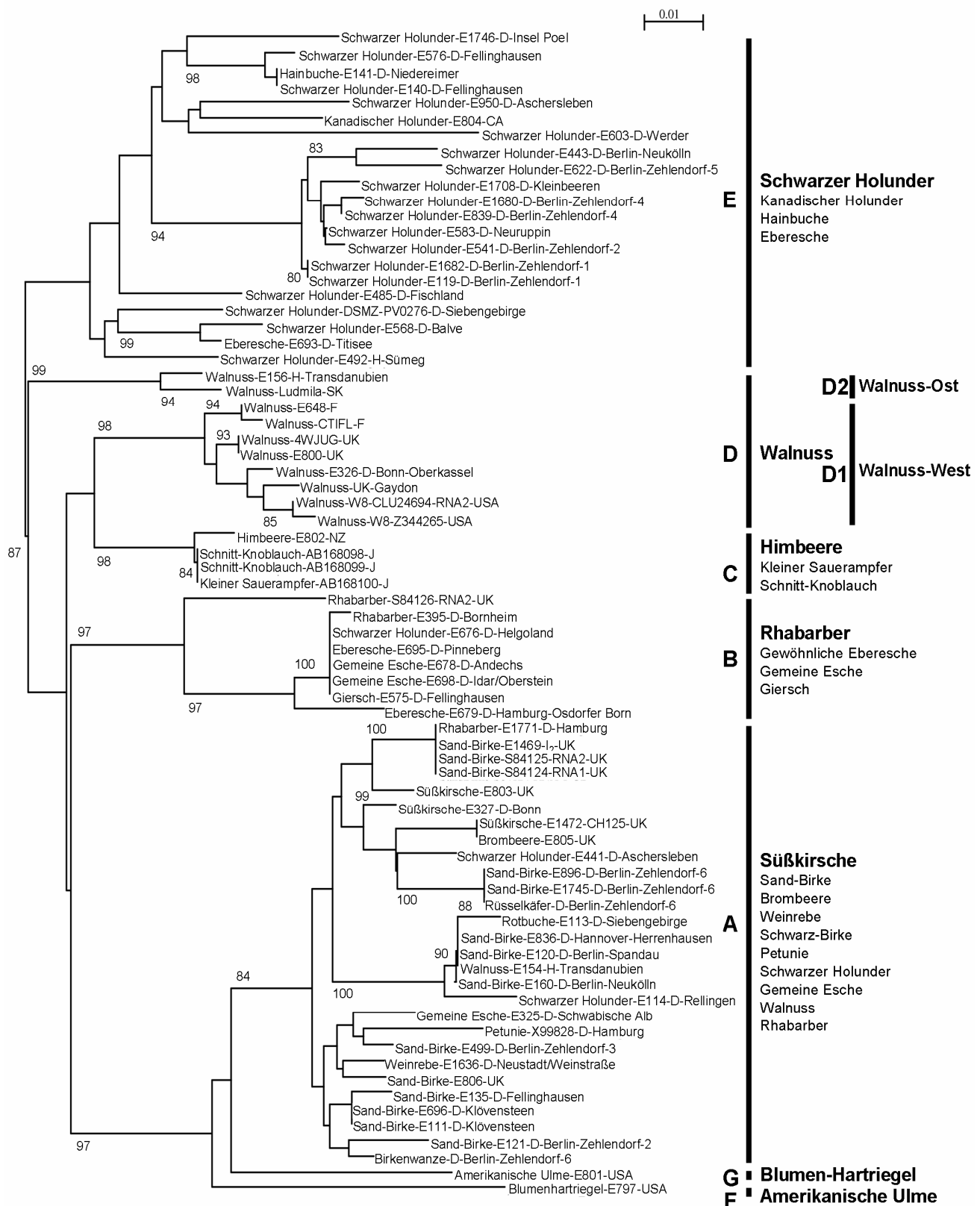


Abb. 9: Phylogenetische Analyse, basierend auf dem Vergleich von 73 CLR-V-Sequenzen der 3'UTR mit einer Länge von 280 bp, amplifiziert von Originalproben und Isolaten von unterschiedlichen Wirtspflanzenarten und Herkünften.

Alle Daten, die auf in Datenbanken veröffentlichten Sequenzen beruhen, werden mit dem vom European Bioinformatics Institute vom EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) verwendeten Code gekennzeichnet. Die Datenanalyse und der phylogenetische Stammbaum wurden mit Hilfe der Programme ClustalX und NJPlot erstellt. Es werden nur bootstrap-Werte angegeben, die über 80 % liegen.

Tab. 7: Genetische Distanz innerhalb und zwischen den phylogenetischen Gruppen, errechnet mit dem Programm MEGA2 für 280 bp der 3'UTR von CLRV-Proben

Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten	
Gruppenbezeichnung (Anzahl der Gruppenmitglieder)	Genetische Distanz innerhalb der Gruppe in % (280 bp)
Holunder-Gruppe (21)	0 % - 11,1 %
Walnuss-Gruppe (10)	0,4 % - 7,7 %
Süßkirschen-Gruppe (28)	0 % - 6,9 %
Himbeer-Gruppe (4)	0 % - 0,7 %
Rhabarber-Gruppe (8)	0 % - 6,1 %
Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten	
Gruppenbezeichnung	Genetische Distanz zwischen den Gruppen in % (280 bp)
Holunder-Süßkirsche	8,6 % - 16,4 %
Holunder-Walnuss	5,7 % - 13,2 %
Holunder-Himbeere	5,7 % - 12,2 %
Holunder-Rhabarber	7,9 % - 14,0 %
Holunder-Hartriegel	9,6 % - 15,0 %
Holunder-Ulme	11,4 % - 16,0 %
Süßkirsche-Walnuss	7,0 % - 12,5 %
Süßkirsche-Himbeere	6,8 % - 11,1 %
Süßkirsche-Rhabarber	8,9 % - 3,6 %
Süßkirsche-Hartriegel	6,0 % - 9,3 %
Süßkirsche-Ulme	7,0 % - 10,2 %
Walnuss-Himbeere	4,4 % - 6,4 %
Walnuss-Rhabarber	7,0 % - 9,9 %
Walnuss-Hartriegel	9,9 % - 13,4 %
Walnuss-Ulme	10,3 % - 11,7 %
Rhabarber-Himbeere	6,1 % - 8,6 %
Rhabarber-Hartriegel	11,4 % - 11,8 %
Rhabarber-Ulme	11,8 % - 13,6 %
Hartriegel-Ulme	8,9 %

3.11 Identifizierung der Hüllproteinsequenzen von 4 CLRV-Isolaten und phylogenetische Analyse

Aus der Literatur ist bekannt, dass die serologische Reaktivität von CLRV-Isolaten, die aus gleichen natürlichen Wirtspflanzenarten stammen, sehr ähnlich ist, aber zwischen Isolaten aus verschiedenen Wirtspflanzenarten größere Unterschiede auftreten können (3.17). Da die serologische Reaktivität von der Hüllproteinstruktur des Virus abhängig ist, wurde analysiert, wie variabel das Genom innerhalb des Hüllprotein kodierenden Bereichs verschiedener Isolate des CLRV ist.

Für diese Untersuchungen wurden insgesamt 31 verschiedene Isolate ausgewählt (zwei Birken-Isolate (E111, E120, E806), 13 Holunder-Isolate (E441, E443, E485, E492, E568, E576, E583, E603, E799, E804, E839, E896, E950), 6 Walnuss-Isolate (E154, E155, E156, E326, E648, E800), ein Eschen-Isolat (E325), zwei Rhabarber-Isolate (E395, E798), ein Ebereschen-Isolat (E693), das Hartriegel-Isolat (E797), das Ulmen-Isolat (E801), das Himbeer-Isolat (E802), zwei Kirschen-Isolate (E327, E803) und das Brombeer-Isolat (E805).

Die in der Veröffentlichung von ZHOU *et al.* (1998) beschriebenen Primer CLRV-CP1 und CLRV-CP2 wurden für die IC-RT-PCR eingesetzt (2.12). Die Primer wurden aus den Sequenzinformationen von 5 verschiedenen CLRV-Walnuss-Isolaten (W8 (Kalifornien), WOX (England), WRS (Italien) und Wsp (Spanien) abgeleitet. Die eingesetzten Primer liegen ca. 160 Basen vor der Hüllprotein kodierenden Region im Polyprotein bzw. 120 Basen hinter der Hüllprotein kodierenden Region in der 3'UTR. Es wurde getestet, inwieweit sich diese Primer zur Amplifikation der Hüllprotein-Sequenz von CLRV-Isolaten aus gleichen und anderen Wirtspflanzenarten eignen.

Nach Auftrennung der mittels IC-RT-PCR amplifizierten PCR-Produkte im 1 %igen Agarose-Gel ließ sich bei 20 Proben ein Bandenmuster und nur bei neun Proben ein Fragment in der zu erwartenden Größe von 1,8 kb erkennen (Abb. 10 zeigt 29 der 31 untersuchten Proben). Bei einem Teil der Walnuss-Isolate konnte die CP-Sequenz erfolgreich amplifiziert werden (3 von 5). Außerdem ließen sich zwei Holunder-Isolate (6 von 12) mit Hilfe der für die oben genannten Walnuss-Isolate entwickelten Primer amplifizieren. Die Fragmente in der gewünschten Größe der neun Proben wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (2.15), in *E. coli* kloniert (2.16) und anschließend sequenziert (2.19). Nur bei vier von insgesamt 31 untersuchten CLRV-Isolaten der Wirtspflanzen Schwarzer Holunder und Walnuss gelang es somit, das 1,8 kb lange Fragment, das das Hüllprotein kodierende ORF einschließt, mittels IC-RT-PCR zu amplifizieren, zu klonieren und zu sequenzieren. Die Sequenzierung dieser Klone ergab die vollständige Hüllproteinsequenz von den zwei Holunder-Isolaten E603 und E804 sowie von den zwei Walnuss-Isolaten E326 und E648. Die Nukleotidsequenzen wurden im Abb. A4 im Anhang dargestellt.

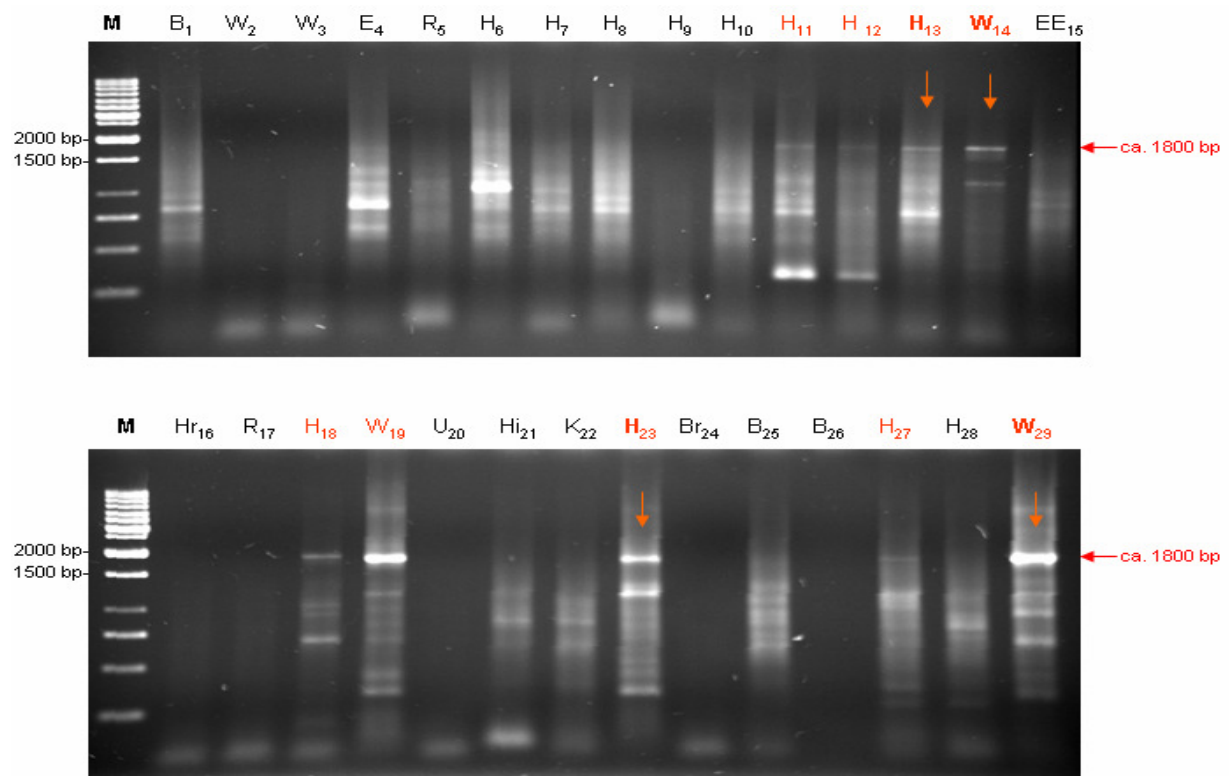


Abb. 10: PCR-Produkte der IC-RT-PCR von 29 verschiedenen CLRV-Isolaten unter Verwendung der Hüllproteinregion begrenzenden Primer CP1 und CP2 nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarose-Gel.

H: Holunder-Isolate; W: Walnuss-Isolate; B: Birken-Isolate; R: Rhabarber-Isolate; K: Süßkirschen-Isolat; E: Eschen-Isolat; EE: Ebereschen-Isolat; Hi: Himbeer-Isolat; Br: Brombeer-Isolat; U: Ulmen-Isolat; Hr: Hartriegel-Isolat. M: 1 kb DNA Ladder (^{MBI}Fermentas); 1. E111, 2. E154, 3. E155, 4. E325, 5. E395, 6. E441, 7. E443, 8. E485, 9. E492, 10. E568, 11. E576, 12. E583, **13. E603**, **14. E648**, 15. E693, 16. E797, 17. E798, 18. E799; 19. 800, 20. 801, 21. E802, 22. E803, **23. E804**, 24. E805, 25. E806, 26. E896, 27. E950, 28. E839, **29. E326** (Kontrolle). Die **rot** markierten Proben weisen ein Fragment der zu erwartenden Größe von 1,8 kb auf und wurden in weitere Untersuchungsschritte mit einbezogen. Die **orangenen Pfeile** bzw. **fett** gedruckten Probenzahlen kennzeichnen die Proben, bei denen es gelang die Hüllprotein-RNA zu sequenzieren.

Die erhaltenen vier neuen Hüllproteinsequenzen aus Schwarzem Holunder und Walnuss wurden mit den vier Hüllproteinsequenzen der Walnuss-Isolate W8, WOX, WRS und Wsp, enthalten in der Veröffentlichung von ZHOU *et al.* (1998), sowie mit der Hüllproteinsequenz des Birken-Isolats I₂, enthalten in der EMBL-Datenbank (S63537, SCOTT *et al.*, 1993), verglichen und ein phylogenetischer Stammbaum aus den abgeleiteten Aminosäureabfolgen erstellt (Abb. 11). Der Beginn des Hüllproteins in der Nukleinsäuresequenz und abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde hierbei durch den Nukleinsäuresequenz-Vergleich mit dem I₂-Isolat (SCOTT *et al.*, 1993) bestimmt, da für dieses Isolat eine Aminosäure-Sequenzierung des Hüllprotein-N-Terminus durchgeführt worden ist.

Tab. 8 zeigt die mit Hilfe des Programms ClustalX 1.8 (2.20) ermittelten Sequenzdiversitäten für die Nukleotid- und Aminosäureabfolgen des CLRV-Hüllproteins innerhalb und zwischen

den Gruppen, die durch die natürlichen Wirtspflanzenarten Holunder, Walnuss und Birke definiert wurden. Der Vergleich der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen ergibt für die beiden Holunder-Isolate E603 und E804 eine Übereinstimmung von 100 % bzw. eine Diversität von 0 % (Intra-Gruppen-Sequenzdiversität in Tab. 8). Für die 6 Walnuss-Isolate (W8, WOX, WRS, Wsp, E326 und E648) liegt die paarweisen Nukleinsäure- bzw. Aminosäure-Sequenzdiversitäten dagegen zwischen 0 % und 6 % bzw. 0 % und 3 %. Die Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten sind sowohl für die Nukleinsäure- als auch Aminosäure-Sequenzen etwa um den Faktor 3 größer. Für den Vergleich von Holunder- und Walnuss-Isolaten ergeben sich z. B. 16 % bis 17 % für die Nukleinsäuresequenzen und 8 % bis 9 % Unterschied für die Aminosäuresequenzen. Für den Vergleich der Birkengruppe mit der Walnuss- und Holundergruppe ergeben sich sogar noch größere Distanzwerte, z. B. liegt die Aminosäure-Sequenzdiversität für den Vergleich des Birken-Isolats mit den Holunder-Isolaten bei 13 % bis 14 %.

Tab. 8: Sequenzdiversitäten innerhalb und zwischen den phylogenetischen Gruppen, errechnet im Vergleich der Nukleotid- (1539 nt - 1545 nt) und Aminosäure- (512 aa - 515 aa) Sequenzen mit dem Programm ClustalX

Gruppenbezeichnung (Anzahl der Gruppenmitglieder)	Nukleinsäuresequenzen	Aminosäuresequenzen
Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten		
Holunder-Gruppe (2)	0 %	0 %
Walnuss-Gruppe (6)	0 % - 6 %	0 % - 3 %
Birken-Gruppe (1)	-	-
Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten		
Holunder-Walnuss	16 % - 17 %	8 % - 9 %
Walnuss-Birke	20 % - 21 %	13 % - 14 %
Holunder-Birke	22 %	16 %

In Abb. 11 wurde die Aminosäure-Sequenz des Hüllproteins aller neun Isolate im Vergleich dargestellt. Der Vergleich zeigt neben den Sequenzdiversitäten auch eine uneinheitliche Aminosäuresequenzlänge der Isolate. Die Isolate E603, E804, E326, E648, Wsp, W8 und WOX besitzen eine einheitliche Hüllproteinlänge von 1539 bp (512 aa). Das Isolat Birch-I₂ ist mit einer Hüllproteinlänge von 1542 bp (513 aa) um eine Aminosäure und das Isolat Walnuss-WRS mit einer Hüllproteinlänge von 1545 bp (515 aa) um drei Aminosäuren länger.

Die phylogenetische Analyse ergab für die 9 Hüllprotein-Aminosäuresequenzen 3 Gruppen, die durch hohe bootstrap-Werte gestützt werden. Auch hierbei zeigten sich, wie bei der phylogenetischen Analyse der 3'UTR (3.10), Gruppierungen nach den Original-Wirtspflanzenarten Holunder, Walnuss und Birke (Abb. 12).

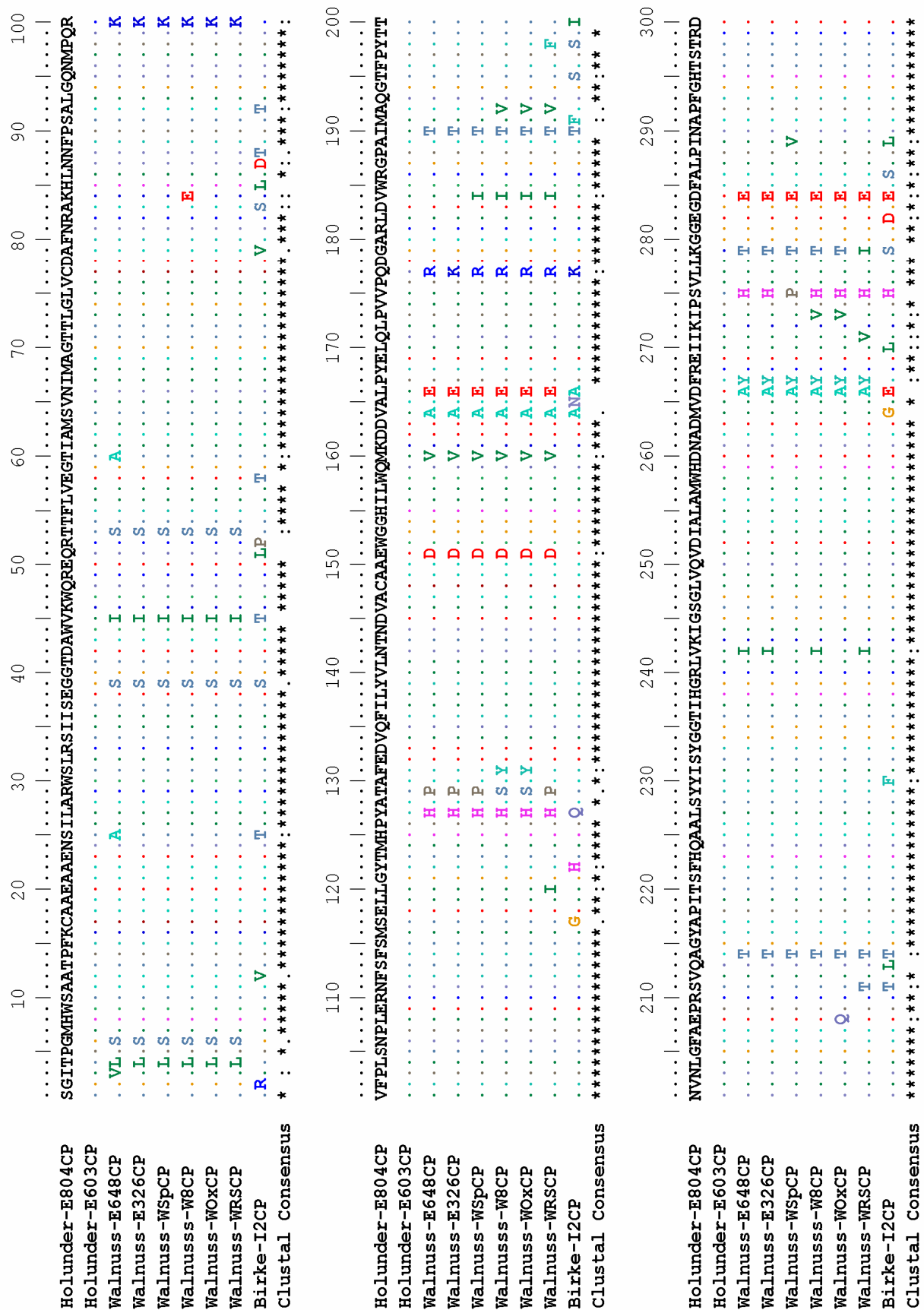
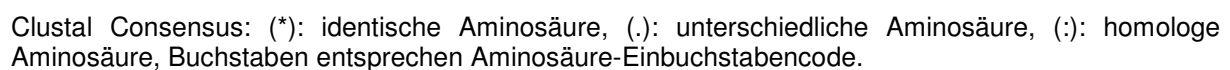


Abb. 11 (1): Vergleich der Hüllprotein kodierenden Aminosäuresequenz von 9 verschiedenen CLRV-Isolaten aus 3 unterschiedlichen Gehölzgattungen.

Clustal Consensus: (*): identische Aminosäure, (.): unterschiedliche Aminosäure, (:): homologe Aminosäure, Buchstaben entsprechen Aminosäure-Einbuchstabencode.



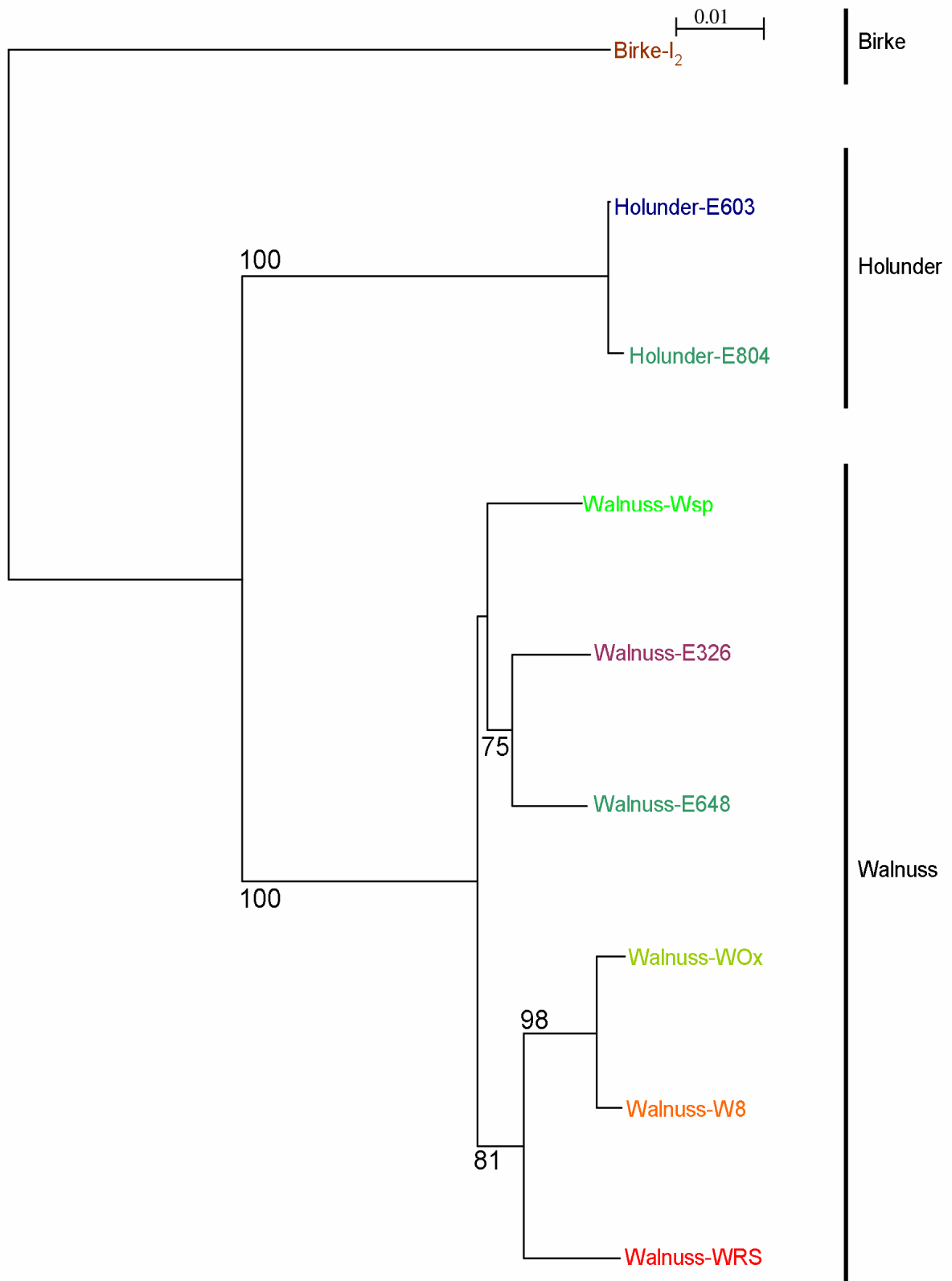


Abb. 12: Phylogenetische Analyse der 512 bis 515 Aminosäuren langen CLRV-Hüllprotein-Sequenz von neun verschiedenen Isolaten aus den drei Wirtspflanzenarten Walnuss, Schwarzer Holunder und Sand-Birke.

Die Sequenzen der Walnuss-Isolate WOX, W8, WRS, Wsp wurden der Veröffentlichung von ZHOU *et al.* (1998) entnommen. Die Sequenz des Birken-Isolats I₂ ist in der EBI-Datenbank unter der EMBL-Nummer S63537 (SCOTT *et al.*, 1993) zu finden. Die Herkünfte der Isolate E326, E603 sind in Kapitel 2.1.1, die der Isolate E648 und E802 in Kapitel 2.2 aufgeführt.

3.12 Rekombinationsanalyse

Mit Hilfe einer Rekombinationsanalyse (2.24) wurde getestet, ob innerhalb der untersuchten Genombereiche (innerhalb der 3'UTR sowie innerhalb der Hüllproteinregion) zwischen geographisch benachbarten oder im Gewächshaus vermehrten Virus-Genotypen Anzeichen auf Rekombinationen zu finden sind, die zu Missgruppierungen in der phylogenetische Analyse führen können.

Die Rekombinationsanalyse wurde mit sechs verschiedenen Programmen durchgeführt (2.24). Die Ergebnisse dieser Analyse ergeben für die 420 bp lange Sequenz der 3'UTR von 67 verschiedenen CLRV-Proben keine Hinweise auf das Vorliegen von Rekombinationsereignissen. Auch für die 9 Hüllproteinnukleotidsequenzen finden diese 6 Programme keine Rekombination, mit Ausnahme von RDP (Abb. 13), das bei dem Isolat CLRV-WRS, aus der Veröffentlichung von ZHOU *et al.* (1998), von Position 1021 bis 1028 ein kurzes Stück anzeigt, dass sich von allen anderen deutlich unterscheidet und daher eine Rekombination vermuten lässt.

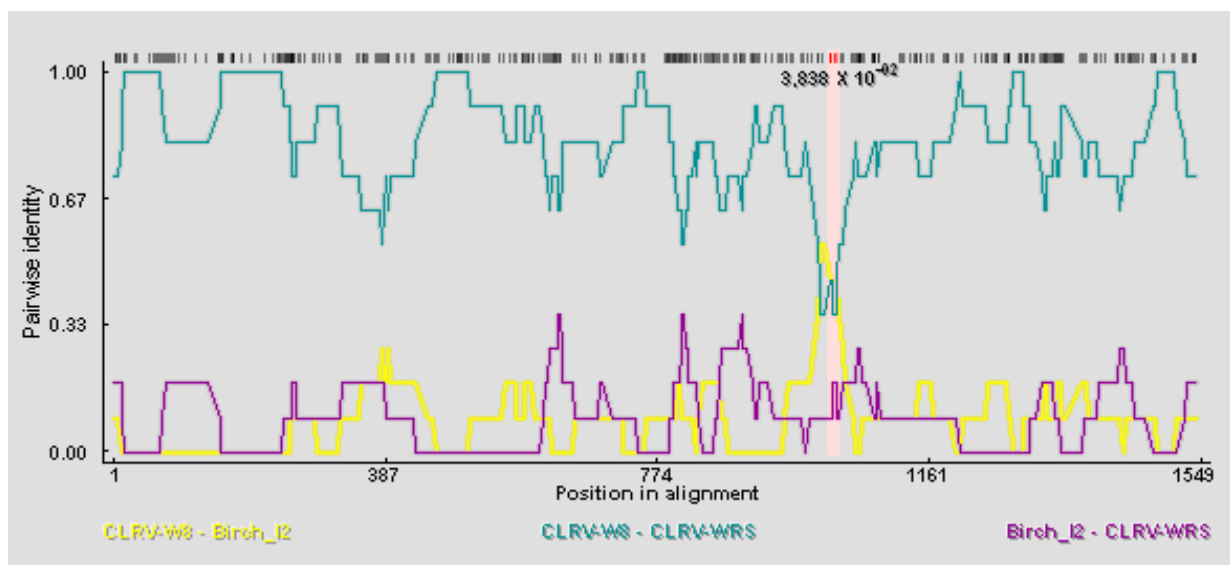


Abb. 13: Rekombinationsanalyse der Hüllproteinsequenzen mittels RDP.

Die Rekombinationsanalyse wurde mit allen 9 CP-Sequenzen durchgeführt. Die Kurven deuten bei dem Isolat CLRV-WRS zwischen den Basen 1021 und 1028 auf eine Rekombination hin.

Eine genauere Betrachtung der Sequenz in diesem Bereich lässt jedoch eher die Vermutung zu, dass der Sequenzunterschied auf einem Sequenzierungsfehler beruht, wo GTGAT um eine Base verschoben ist, weil davor 2 statt 3 C-Basen im Sequenz-Gel aufgelöst wurden (Abb. 14).

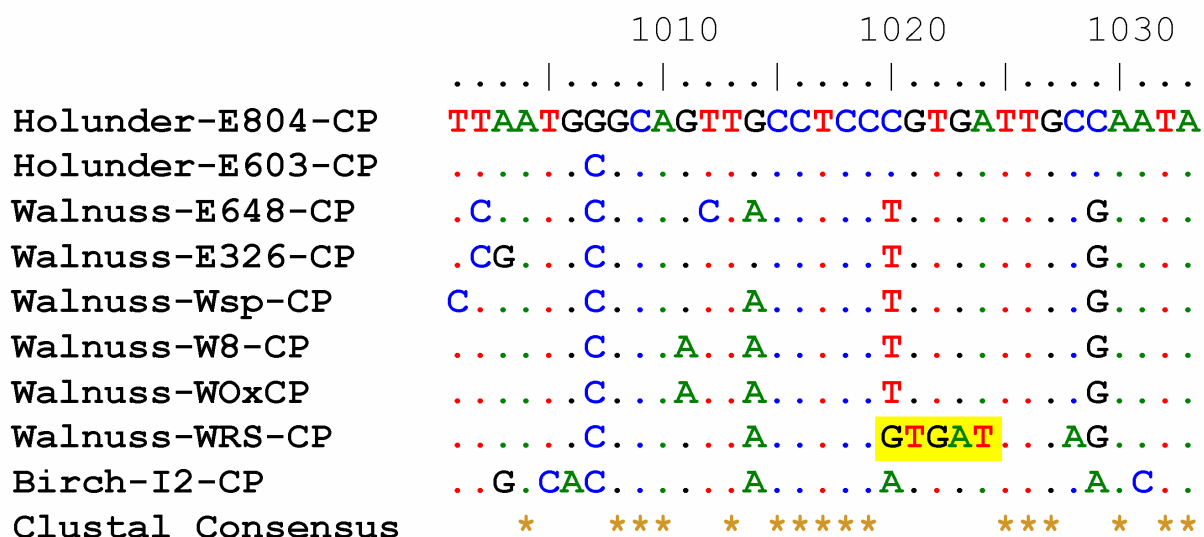


Abb. 14: Ausschnitt des Sequenzvergleichs der CP-Nukleotidsequenz von 9 CLRV-Isolaten. Der gelb hinterlegte Bereich kennzeichnet die Basenpositionen, die auf eine Rekombination hindeuten.

3.13 Vervollständigung der 3'UTR der RNA2 von CLRV-Holunder-Isolat E603

Bislang liegen weder vollständige Sequenzinformationen für die RNA1 noch für die RNA2 des CLRV-Genoms vor. Zur Analyse des CLRV-Genoms wurde daher zunächst versucht, den Genombereich zwischen der Hüllproteinregion und der konservierten 420 bp langen Region am 3'-Ende des Genoms auf der RNA2 durch RT-PCR zu vervollständigen. In dieser Arbeit wurde der Hüllprotein-Bereich (1539 nt, 3.11) und 3'UTR-Bereich (371 nt, 3.10) des Holunder-Isolats E603 für phylogenetische Analysen erfolgreich bestimmt. Abb. 15 zeigt eine schematische Darstellung der RNA1 und RNA2 des CLRV-Genoms. Die blauen Balken kennzeichnen die in Abb. A3 und in Abb. A4 im Anhang beschriebenen Sequenzbereiche für das Holunder-Isolat E603, der rote Balken den mittels RT-PCR analysierten Bereich. Zur Erschließung des fehlenden Bereichs zwischen der Hüllprotein- und 3'UTR-Sequenz wurden in die RT-PCR wurden aufgereinigte Viruspartikel des Isolats E603 eingesetzt (3.5).

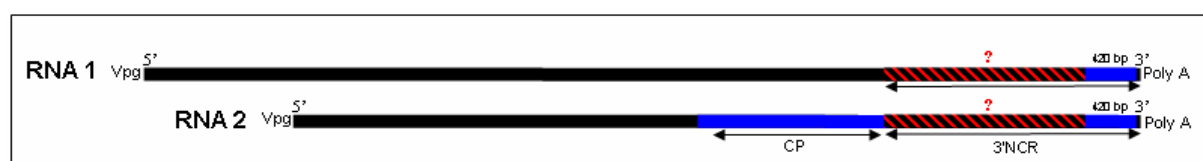


Abb. 15: Schematische Darstellung des CLRV-Genoms

Die blauen Balken kennzeichnen die in Abb. A3 und Abb. A4 im Anhang beschriebenen Sequenzbereiche für das Holunder-Isolat E603, der rote Balken den mittels RT-PCR analysierten Bereich.

Ausgehend von der bekannten Hüllprotein- und der 3'UTR-Sequenz des Isolats E603 wurde das fehlende Stück der 3'UTR mit Hilfe der Primer RW2rc (antisense) und CP2rc in einer RT-PCR amplifiziert (2.13.1). Die Abb. 16 zeigt die schematische Darstellung des untersuchten Genombereichs der RNA2 sowie die Bindungsstelle des verwendeten Primers CP2rc. Der grüne Balken in dieser Grafik beschreibt den bekannten Sequenzbereich des Polyproteins, dessen Funktion jedoch bislang unbekannt ist, der blaue Balken die bekannte Hüllproteinregion, der schwarze Balken die bekannte 3'UTR und der rot/schwarz gestreifte Balken den Sequenzbereich, der erschlossen werden sollte.

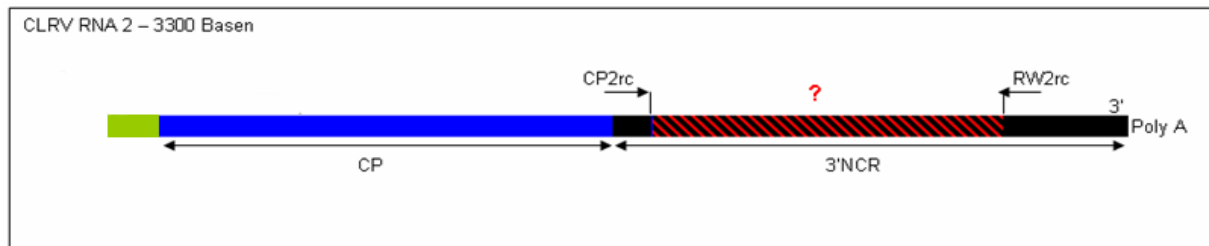


Abb. 16: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen innerhalb der bekannten Sequenzbereiche auf der RNA2 des CLR-V-Isolats E603

Grün: Teil des Polyproteins mit unbekannter Funktion, blau: Hüllprotein-Region, schwarz: 3'UTR, dessen Sequenz bekannt ist, rot/schwarz: Sequenzbereich der 3'UTR, dessen Sequenz unbekannt ist.

Es wurde ein ca. 850 bp langes Fragment nach (2.13.1) in der RT-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten (2.15), kloniert (2.16) und anschließend sequenziert (2.19). Die Sequenzierung ergab ein 813 bp langes Fragment, das ausgehend vom RW2rc-Primer der bekannten 420 bp langen Sequenz in 5'-Richtung liegt. Der Vergleich mit den in der Datenbank verfügbaren Sequenzen bestätigt durch hohe Identitäten in der Basenzusammensetzung die Zugehörigkeit der Sequenz zur 3'UTR. Da nur 813 bp statt den zu erwartenden ca. 1100 bp amplifiziert werden konnten, legte dies die Vermutung nahe, dass die verwendeten Primer mehrfach in der 3'UTR gebunden haben, und es wurde nach weiteren Übereinstimmungen der Primersequenz innerhalb der Sequenz gesucht. Jedoch zeigten weder der Primer CP2rc noch RW2 bzw. die ersten und die letzten 6 Basen dieser Primer Übereinstimmungen mit den sequenzierten 813 Basen. Basierend auf den Nukleotidinformationen dieser 813 bp langen Sequenz wurde der Primer CLR-V-E603-3'A abgeleitet und in Kombination mit dem Primer CP2rc in die RT-PCR (2.13.2) eingesetzt. Das PCR-Produkt zeigte im 1 %igen Agarose-Gel eine distinkte Bande der zu erwartenden Größe von ca. 400 bp. Das PCR-Produkt wurde direkt in *E. coli* kloniert (2.16) und sequenziert (2.19). Nach Auswertung der identischen Sequenz von zwei Klonen konnte ein 393 bp langes Fragment und somit die vollständige Sequenz der 3'UTR des Holunder-Isolats E603 erhalten werden. Zusammen mit der Hüllproteinsequenz liegen damit Sequenzinformationen von 3305 Basen vor (Abb. 17). Die Sequenzen der Primer CP2rc und

>Schwarzer Holunder E603

Primer CP1

GTACTCATTGGAGACTGCAGCGTTCCAGCCAGCAATCGGTTTGTGTGTCAGGGTTCCTCCCGTCAGGTGGGACCTCGACGC
 GTATCCGAGGGGCGGGTTGACCGTGGTGATTTCCTGGATCGAGGTGCTAGGGGGCAACAGCAACCCCTGTAAATATGACA
 CTGCAA**TCTGGTATCACACCGGGTATGCATTGGTCCGACGCCACGCCTTTTAAGTGTGCTGCGGAGGCGGCCGAGAATTCC**
 ATCTTGGCTCGTTGGTCCCTTCGTTCTATTATTAGTGAAGGAGGGACTGATGCTTGGGTTAAGTGGCAGCGCGAACAGCGC
 ACCACTTTTTTGGTCGAGGGGACTATCGCCATGTCTGTAAATATTATGGCTGGTACTACCCTGGGTTTAGTGTGTGATGCT
 TTTAATCGGGCAAACACTTAAACAATTTTCCTAGCGCTTTGGGGCAAATATGCCCTCAGAGGGTGTTCCTATTGAGTAAT
 CCTCTGGAGAGAAATTTTAGCTTCTCCATGAGTGAGTTATTGGGTTATACATGCATCCCTATGCCACAGCATTGAGGAT
 GTACAATTCATTCTTTATGTTCTCAACACTAATGATGTCGCTTGCAGCGCTGAATGGGGAGGACACATTCTCTGGCAAATG
 AAGGACGACGTTGCCTTACCTTATGAAGTGCAGTTACCTGTGGTTTCTCAGGATGGCGCACGTCTGGATGTCTGGCGCGGC
 CCGGCTATTATGGCCCAAGGCACGTTTCCGTACACGACCAATGTCAATTTGGGTTTCGCCGAACCTAGGTCTGTACAGGCA
 GGGTATGCCCCAATTACTTCATTCCACCAGGCTGCCCTGTCTACTACATCTCATATGGTGGGACCATCCATGGCCGACTC
 GTTAAATCGGCTCTGGATTAGTGAAGTGGACATTGCGCTGGCCATGTGGCAGACAATGCCGACATGGTGGATTTTAGG
 GAGATTATTAAATCCCTAGTGTCTGCTCAAAGGTGGTGAGGGAGATTTGCGCTCCCCATCAATGCTCCCTTTGGGCAT
 ACATCGACTCGGGATCGCGGCCAACCTTTGGCCGTGTGTCTCGTTTCCGGAGTGGTAGCTCCGAAAGATTGCTCAGCCCCC
 TACCGCTTCATGATATATTTTGATAGGGTTGAGTTTAAATGCGCAGTTGCCCTCCCGTGATTGCCAATAGGCTTCAGTTTCTC
 TGGGCATCGTTTTCGGACTTTGCACAGTAGTGCCTGCTGCCACACGCACCTGGATGATACCGTGTGCGCCCTCCGACTAC
 AAGGTTGAAGGTGCTACCATTAAATGGAGGCACACCCGCTTGCCCGCTTGATTGCTTCGGCGGGGATGTTCCAGGGGACT
 ATGAAGTTTATCTTACGGTGGACTTTCTCTTCCCTTTAACCACCCCCAGCACGTATGTGCAGCTGACGCACAAGTTTGGG
 ACAGCCACGGCTGGCGAGTCTTATTTGACTAAGCTAGCACATGCCGCTCAAGCCACTGAGATTAGTCTGGATGTGGTTGTG
 GCGGGTCTTGGGGGCTTTACGCGCTCAGGGGTGGCTGAATCTAGAGAGAATTTGTGCGCATCTCTCTGAGTAAACCGAGC
 GACTTGGCTAAGCTTGATATTATTGTGCGAGCTTTTGCCCGGGTTAGGTTTAGGGACCTACAATAACCCCTCTCGTGCCTG
 TTTAA**CGTG**CATGAGTAGCTTAGCATGCTTAATGCTCAGTCCCATAGCTGTCTCTAAGGGCGGGTCGTTGCCGTAAGTAAC
 GTGCAGAAGGATGTCATCGCTTAGCT**GGTTGAAGATGTGAATGGCAGCGTTG**CGCACCTCCAGTCTCCAGTCTAACTGGT
 TCCACGAGACAACACGTGGATCTGAAATGGTAGTAAACTACCCGCTCAGAGTAACGCCTGAGTTGTTTAGCATATGTTAAT
 GGAATTACCGTAAGGTTGGTACCCCCGAAAGGGGCTCCTGTTGCTTGCCTGGTGGTATTTTCTTCTTAGCATTTTTGT
 TAGTTTACTACTGGAAGCAGTCGACTTGGGAAACAAAGTTTCATCCGGTCTGCCAGGGACGAAGACCTAAATCCAATGC
 CCCCCCTCTACTGGAGAGGTTAACTCCAGACACCTCTGCCGAGGAGGATAACTTCGGACGGTGTGGATGCCGGT**CCTATCC**
 Primer E603-3'A
ATTTGGTGGGTGTTCTTAAATAAAGTCTTACCTTATTTGTTTCGGGAAGCGAACATCATATCTGCACCTAGTTTATGTTT
 ATTCTGTTTTAGTTGTAGAGTCATGCGCACACGGTATGTGATTAGCCGTGTAGTACGCGAAAGTTTCCGCTCTTAGTAGCA
 CCATTGCGATGGTGTCCACGAGTGCTCTGCTATGTGATGTTCTTCATTTAGCTGTACATAATTGGAATTACGGACGTAGTC
 CCCTCCAGAGCTGGTGTGTAGGATGCTTGATCCTGGTGTGATATTGGGCGACCCCATTTGATGTATCAGAAAAGTTCCCC
 GAAACCAGCCACGTTCTTGGCGGGAATAGTGGAGGTGATCTCTAATTGTGTGCAGTTTAAATTCCTTTGAACCTAACGT
 TAGCCGAAACGAGTAGTTAGCGCTGCATTGGTCCCGTATGACTTTTACGTACGGGGCGGTCTTAATTTACAGGTTCTATCTA
 ACCTTAGTCGAAACCAGTAATTTCTCAAACACTCCATTAAAGTCTTGAATTTATAGTAAGTGGGCTTTCTATCTTACCCC
 ACATTGTGTTGGGATGCGTAGTCACCAATCTTACGAACTTTTCTACTTAGGTAATATGGTGTGCTGGCAGTGAAAAGTT
 AGACATGATGAGTGGGCGTTCTCTTTAAACGTCATTAAACGGAGTATCACAATTC**TGGCGACCGTGTAACGGCA**ACAGTGT
 TAAGGTGACTCTGGTGGACTGACTGCAATCAGTTTCATGCGACCGGTCTTAGTAGAATTAAGAATGCTGCAGCCAGGGCT
 CCGTGAGTATTAGTTAACGAATATCTACTGCCACCCGTTATAGTGTGTGGTGGTCCCTCTATCTTACTTGGTTACTGAGCCG
 GGCATGCTGGTAACATGCCCGTGAATTTGGATTCCAAGCCCAAGAATTTAGGGGGTTATGTGGGTAGATAGCGTTAGCTAG
 GGGTTGTTTCGCGATATTTGTTGCCCGTTTGTGTTACAAAATTCGCTTATTGTATGAGTGTGCGACTCAAGCAGTGTTTA
 GTTTTATTCTCTGATTTAAATGTTTACTTTTAGTTTT**CCTTTTACGTAATCTTTCCGAC** + ? Basen + PolyA
 Primer RW1rc

Primer RW2

Abb. 17: 3305 bp lange Nukleotidsequenz des Holunder-Isolats E603

Die Sequenz beginnt 353 Basen vor der für das Hüllprotein kodierenden Region und ca. 2 Basen vor dem 3'PolyA-Schwanz. Schwarze Buchstaben: 3'UTR; **grüne** Buchstaben: Primersequenzen; **blaue** Buchstaben: Hüllproteinregion. Alle Primer wurden in 5'-3'-Richtung angegeben. Die in die RT-PCR eingesetzten antisense Primer wurden revers-komplementär dargestellt und mit rc bezeichnet.

RW2rc müssen noch auf Richtigkeit überprüft werden, da für diesen Bereich keine Überlappungen vorliegen.

Neben der Sequenz des Holunder-Isolats E603 wurden die zwei Walnuss-Sequenzen W8 (EMBL-Nummer Z34265) und W8-RNA2 (EMBL-Nummer U24694), die aus zwei unterschiedlichen Veröffentlichungen stammen, und die Sequenz der RNA1 und RNA2 des Birken-Isolats I₂ (EMBL-Nummer S84124 und S84125) in die Untersuchungen mit einbezogen. Der Vergleich deckte Unterschiede in der Sequenzlänge der 3'UTR auf. Die Sequenzen der beiden RNAs des Birken-Isolats mit einer identischen Länge von 1486 Basen unterscheiden sich lediglich in zwei Basen. Auch die Walnuss-Sequenzen sind mit einer Gesamtlänge von 1509 Basen identisch, unterscheiden sich jedoch in vier Basen voneinander. Die Holunder-Sequenz ist mit einer Gesamtlänge von 1530 Basen deutlich länger. Die Sequenzdiversität der gesamten 3'UTR zwischen den Birken- und Walnuss-Sequenzen liegt bei 22,8 % bzw. 22,9 %, die Sequenzdiversität zwischen den Birken- und Holunder-Sequenzen liegt bei 23,0 % bzw. 23,1 % und die Sequenzdiversität zwischen den Walnuss- und Holunder-Sequenzen liegt bei 16,8 %. Dies zeigt, dass sich die Sequenzen der verschiedenen Isolate deutlich voneinander unterscheiden und die im Vergleich der 380 bp langen Sequenzen ermittelten maximalen Sequenzdiversitäten sich beim Vergleich der vollständigen Sequenz der 3'UTR nochmals um 5,1 % bis 10,4 % erhöhen. Der Sequenzvergleich der 3'UTR wurde in Abb. A5 im Anhang dargestellt.

3.14 NEI's G_{ST}-Analyse der genetischen Diversität in Abhängigkeit von epidemiologischen Faktoren

Durch statistische Verfahren ist es möglich, Populationsstrukturen innerhalb und zwischen Gruppen gleicher Merkmale zu untersuchen, um Auskunft über die statistische Sicherheit von Korrelationen zu erhalten. Die phylogenetische Analyse von 380 bp der 3'UTR von 67 CLRV-Isolaten zeigte eine auffällige Gruppierung nach den natürlichen Wirtspflanzen (3.10). Um diese Beobachtung statistisch abzusichern und um die Bedeutung von den epidemiologischen Faktoren Wirtspflanze und Herkunftsgebiet in Bezug auf die genetische Diversität des CLRV gegeneinander abzugrenzen, wurde untersucht, ob und inwiefern CLRV-Isolate, die von der gleichen Wirtspflanze stammen, bzw. Isolate, die geographisch benachbart sind, gleiche oder ähnliche molekulare Eigenschaften zeigen und ob diese Eigenschaften statistisch gesichert sind.

Hierzu wurden 67 Sequenzen der 3'UTR einer Größe von 380 bp entsprechend verschiedener Kriterien (Original-Wirtspflanzenart, Ursprungsland) als Subpopulationen definiert und die genetische Diversität innerhalb dieser Gruppen (Intra-Subpopulations-

diversität) und zwischen diesen Gruppen (Inter-Subpopulationsdiversität) berechnet. Zusätzlich wurde der NEI's G_{ST} -Koeffizient (coefficient of gene differentiation) berechnet (NEI, 1972), der eine statistischen Auswertung und vergleichende Analyse der Korrelation zwischen den definierten Subpopulationen und der berechneten genetischen Diversität dieser Gruppen ermöglicht (2.21). Als Kontrolle wurden die gleichen Berechnungen auch im Vergleich mit den verschiedenen phylogenetischen Gruppen der Isolate durchgeführt, die durch die phylogenetische Analyse als Subpopulationen definiert wurden (3.10). Die Resultate dieser Berechnungen werden in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Vergleichende Analyse der genetischen Diversität des 3'UTR von CLRV-Subpopulationen definiert anhand verschiedener epidemiologischer Parameter.

	Subpopulationen definiert durch das Ursprungsland	Subpopulationen definiert durch die Wirtspflanzenart	Subpopulationen definiert durch die phylogenetische Gruppierung
Diversität der Gesamtpopulation ¹	0,092 ± 0.009	0,091 ± 0.009	0,090 ± 0.009
Intra-Subpopulationsdiversität ¹	0,068 ± 0,007	0,056 ± 0.005	0,027 ± 0.003
Inter- Subpopulationsdiversität ¹	0,024 ± 0.004	0,035 ± 0.004	0,063 ± 0.007
NEI's G_{ST} -Koeffizient der Differenzierung ^{1,2}	0,262 ± 0.030	0,387 ± 0.028	0,701 ± 0.024

¹Genetische Distanz und Standardabweichung basierend auf einer bootstrap-Analyse mit 500 Wiederholungen. ²Zur Kalkulation der durchschnittlichen Intra- und Inter-Populationsdiversität und des NEI's Koeffizienten wurden nur Gruppen mit 3 oder mehr Mitgliedern in die Analyse einbezogen

Die Ergebnisse der Berechnungen zeigen, dass die CLRV-Proben bei der Gruppierung nach verschiedenen Ursprungsländern mit einem niedrigen G_{ST} -Wert von 26 % keinen signifikanten Zusammenhang zu ihrer paarweisen genetischen Diversität aufweisen. Die durchschnittliche Intra-Populationsdiversität der CLRV-Proben mit einem Wert von 6,8 % liegt im Vergleich zur Inter-Populationsdiversität mit einem Wert von 2,4 % fast dreifach so hoch. Somit ähnelt die Diversität innerhalb der Länder eher der Gesamtdiversität aller CLRV-Proben (9,2 %). Der niedrige G_{ST} -Wert von 26 % bestätigt zusätzlich diese Aussage. Er zeigt, dass lediglich ein Viertel aller Proben sich nach dem Ursprungsland gruppieren und somit durch die Subpopulation definiert werden. Daher unterscheidet sich die Subpopulation in der paarweisen genetischen Diversität nicht signifikant von der durchschnittlichen genetischen Diversität der CLRV-Gesamtpopulation. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man

die natürliche Wirtspflanze der Proben verwendet, um die Gruppen der Subpopulationen zu definieren. In diesem Fall sind die durchschnittlichen Inter- und Intra-Populationsdiversitäten zueinander ähnlicher und der G_{ST} -Wert von 39 % ist um den Wert 1,5 erhöht, d. h. das 39 % aller Proben durch die Original-Wirtspflanzenarten definiert wird. Der G_{ST} -Parameter erhöht sich auf 70 %, wenn man als Kontrolle die Gruppen, die die phylogenetische Analyse der Sequenzen ergeben hat, verwendet. Die hier beschriebene Analyse stützt die Hypothese, dass CLRV-Isolate und Proben, die die gleichen Original-Wirtspflanzenarten besitzen, in engerer genetischer Beziehung zueinander stehen, als Proben desselben Ursprungslandes.

Obwohl aus Abb. 9 und Tab. 9 ersichtlich ist, dass CLRV-Proben, die aus derselben Wirtspflanze stammen, mit größerer Wahrscheinlichkeit genetisch verwandt sind, gibt es einige deutliche Ausnahmen, die zu dem relativ niedrigen G_{ST} -Wert von 38,7 % führen. Diese Ausnahmen umfassen phylogenetischen Gruppen, die Proben von einer Vielzahl an unterschiedlichen Wirtspflanzen beinhalten wie z. B. die Rhabarber-Gruppe (B). Diese Gruppe weist eine ausgesprochen niedrige durchschnittliche Diversität von 0,015 ($\pm 0,003$) auf, besteht jedoch aus Proben von 4 unterschiedlichen natürlichen Wirten. Ähnlich verhält es sich in der Süßkirschen-Birken-Gruppe (A), die eine Diversität von 0,033 ($\pm 0,005$) aufweist und aus Proben besteht, die von 10 unterschiedlichen Wirten stammen (Süßkirsche, Sand-Birke, Schwarz-Birke, Wein, Rot-Buche, Brombeere, Schwarzer Holunder, Gemeine Esche, Walnuss und Rhabarber). Ferner ist auffallend, dass einige Proben von der gleichen Original-Wirtspflanzenart stammen, auf Grund der Sequenzinformationen jedoch in unterschiedliche phylogenetische Gruppen fallen. So ordnet sich beispielsweise das Schwarze Holunder-Isolat E676 in die Rhabarber-Gruppe und das Schwarze Holunder-Isolat E441 in die Süßkirschen-Gruppe ein. Bemerkenswert ist auch, dass die Sequenzen der beiden Schwarzen Holunder-Isolate E441 und E950, die in aufeinander folgenden Jahren (2002 und 2003) in ein und derselben kleinen Bestandsgruppe von Birken- und Holundergehölzen an der Stadtmauer von Ascherleben gesammelt wurden, zwei verschiedenen phylogenetische Gruppen zugeordnet werden.

3.15 Mantel-Test-Analyse der genetischen Diversität in Abhängigkeit von epidemiologischen Faktoren

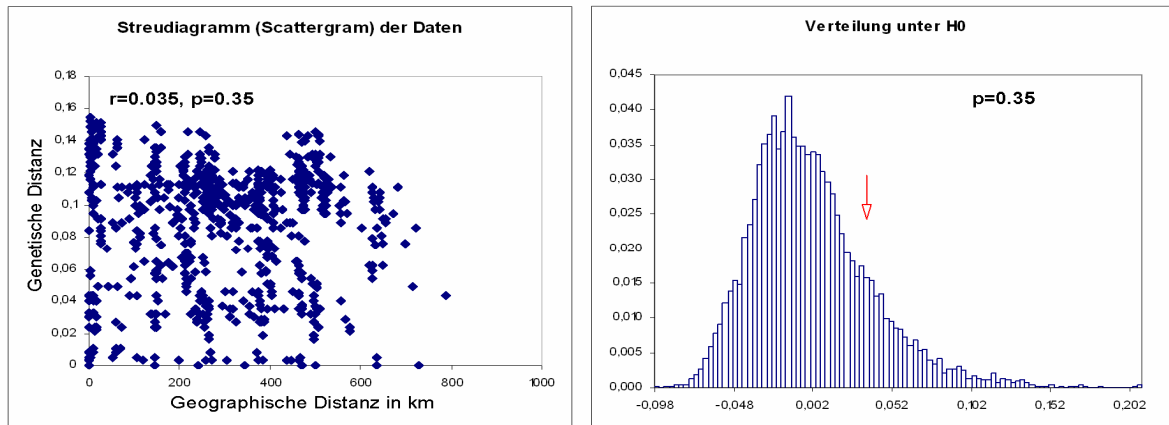
Eine weitere geeignete statistische Methode für populationsgenetische Untersuchungen von Virus-Populationen ist neben der Berechnung des G_{ST} -Koeffizienten die Korrelationsanalyse mittels Mantel-Test (2.22). Mit Hilfe dieser Korrelationsanalyse wurde untersucht, ob die genetischen Unterschiede zwischen CLRV-Populationen in signifikanter Beziehung zu den natürlichen Wirtspflanzen der Isolate stehen, wie es der G_{ST} -Koeffizient tendenziell zeigte, oder ob auch andere Faktoren, wie z. B. die geographischen Abstände, eine Rolle spielen,

wie es für andere Viren bereits beschrieben worden ist (BOUSALEM *et al.*, 2000; GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2001) und ob diese sich mit Hilfe der Korrelationsanalyse von dem Einflussfaktor Wirtspflanze statistisch abgrenzen lassen.

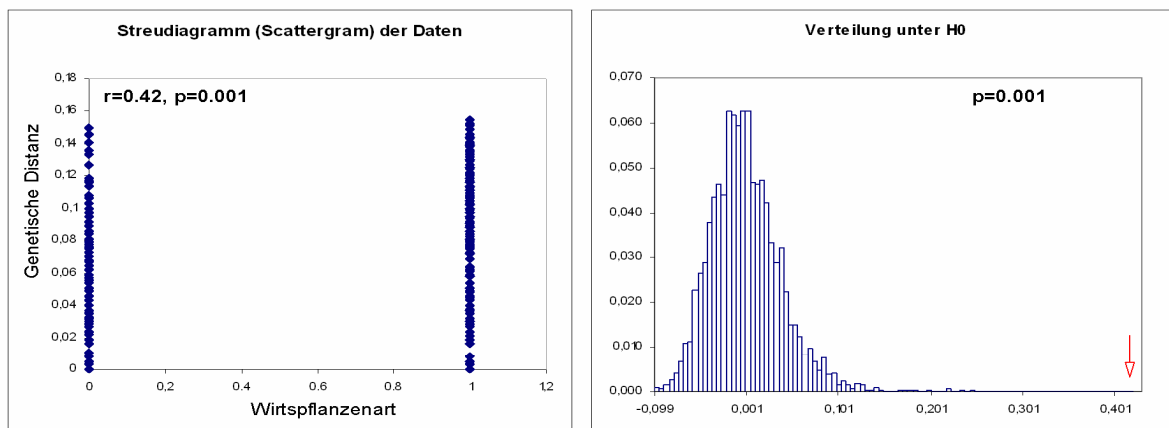
Es wurden hierbei nur deutsche Proben und Isolate in die Untersuchungen aufgenommen, da für diese die Standorte bekannt sind, wodurch sich die geographischen Distanzen der der Standorte zueinander genau berechnen lassen. Ferner bilden die deutschen Isolate und Proben mit einem Anteil von zwei Drittel und einem weiten Wirtspflanzenkreis einen repräsentativen Anteil des Gesamten.

Es wurden die geographischen Abstände aller deutschen Proben ermittelt und die Korrelation der Daten in Abhängigkeit von der genetischen Distanz mittels Mantel-Test berechnet. Dieser Test ermöglicht die Quantifizierung der statistischen Korrelation der genetischen Distanz (A) der CLRV-Proben (380 bp Sequenzlänge) im Vergleich zu den natürlichen Wirtspflanzen (B) sowie im Vergleich zur räumlichen Distanz (C) zueinander. Die geographischen Distanzen zwischen den Proben wurden anhand von Standortkoordinaten errechnet, die durch ein GPS (Global Positioning System)-Gerät, einem satellitengestützten Navigationssystem, ermittelt wurden (2.22). Insgesamt wurden 41 Proben unterschiedlicher Original-Wirtspflanzenarten aus Deutschland untersucht und jeweils die Wechselbeziehung zwischen zwei Matrizen paarweise mittels Mantel-Test errechnet. Ferner wurde diese Korrelationsanalyse zusätzlich in einem Fall unter Einbeziehung von Proben durchgeführt, die ausschließlich von einer einzigen Original-Wirtspflanzenart stammten. Hierzu wurden die Daten für 18 deutsche Holunderproben verwendet, da für diese Wirtspflanze die größte Anzahl an Proben vorlag. Es wurden jeweils zwei symmetrische Matrizen im zweiseitigen Test nach Pearson untersucht und die Korrelationskonstante (r-Wert) und der Wahrscheinlichkeitswert (p-Wert) bestimmt. Der p-Wert gibt dabei die Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese an (H_0 , kein Effekt), d. h. es wird ermittelt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, das beobachtete oder ein extremeres Ergebnis zu erhalten. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der Wahrscheinlichkeitswert unter das Signifikanz- oder Alpha-Niveau fällt (Irrtums-wahrscheinlichkeit). Als Alpha-Niveau wurden die statistisch üblichen Werte von 5 % (0,05) und eine Anzahl an Permutationen von 10000 gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

A) Korrelation der genetischen und geographischen Distanzmatrix für 41 deutsche CLRV-Proben



B) Korrelation der genetischen und Wirtspflanzenart-Distanzmatrix für 41 deutsche CLRV-Proben



C) Korrelation der genetischen und geographischen Distanzmatrix für 18 deutsche CLRV-Holunder-Proben

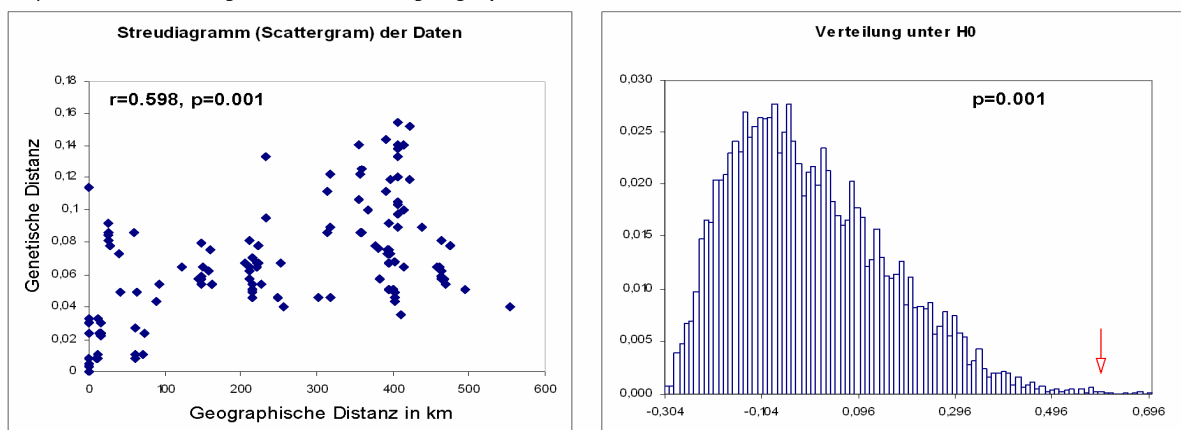


Abb. 18: Statistischer Vergleich mittels Mantel-Test zwischen der genetischen Diversität der 3'UTR von CLRV-Proben (380 bp) in Bezug auf ihre natürliche Wirtspflanze und die geographische Entfernung

Streudiagramm für zwei Wertematrizen (links) und Verteilung von 10000 Zufallspermutationen dieser Wertematrizen dargestellt als Balkendiagramme mit dem Korrelationswert $r(A,B)$ (x-Achse) und korrespondierenden zweiseitigen p-Wert (y-Achse) (rechts). Der rote Pfeil stellt den berechneten Korrelationswert r und Wahrscheinlichkeitswert p dar (Nullhypothese H_0). A) Vergleich der genetischen Distanz mit den geographischen Abständen von 41 CLRV-Proben aus Deutschland. B) Vergleich der genetischen Distanz mit den natürlichen Wirtspflanzenarten des CLRV von 41 Proben aus Deutschland. Streudiagramm: 0 kennzeichnet die Proben gleicher natürlicher Wirtspflanzen, 1 kennzeichnet die Proben unterschiedlicher natürlicher Wirtspflanzen. C) Vergleich der genetischen Distanz mit den geographischen Abständen von 18 CLRV-Holunderproben aus Deutschland.

In Abb. 18A (rechts) ist der berechnete Korrelationswert für die genetischen und geographischen Distanzmatrizen durch einen roten Pfeil dargestellt. Die Verteilung (Balkenkurve) bei Berechnung des Korrelationswertes unter Verwendung von 10000 Zufallspermutationen dieser Matrizen weicht nur unwesentlich von diesem Wert ab, und bestätigt damit die Nullhypothese H_0 , dass keine Korrelation vorliegt. Das Streudiagramm der zwei Matrizen (Abb. 18A, links), in dem die paarweise genetische Distanz gegen die paarweise geographische Entfernung für alle 41 deutschen Proben aufgetragen ist, zeigt mit $r(A,C) = 0,035$ und $p = 0,350$ keine signifikante Wechselbeziehung (da der p-Wert über 0,05 liegt) zwischen der genetischen Distanz und der geographischen Entfernung für alle 41 deutschen Proben. Der hierbei berechnete Korrelationskoeffizient von 0,035 (3,5 %) liegt im Vergleich zum G_{ST} -Koeffizienten mit 0,262 (26 %) wesentlich niedriger. Dies bestätigt die Annahme, dass die Korrelation zwischen der genetischen und der geographischen Distanz nicht signifikant ist. Auch der Vergleich der sechs Birken-Isolate aus Deutschland zeigt im Mantel-Test mit einer Korrelationskonstante von $r(A,C) = -0,077$ und einem Wahrscheinlichkeitswert von $p = 0,791$ keine signifikante Korrelation zwischen der genetischen und geographischen Distanz (Ergebnis nicht graphisch dargestellt). Das gleiche Ergebnis ergibt auch der Vergleich der neun Birken-Isolate aus Deutschland mit der Sequenzlänge von 280 bp. Hierbei liegt die Korrelationskonstante bei $r(A,C) = -0,024$ und der Wahrscheinlichkeitswert bei $p = 0,827$.

Im Gegensatz hierzu ergibt der Mantel-Test zur Korrelation der genetischen Distanz und der Original-Wirtspflanzenart für alle 41 deutschen Proben mit $r(A,B) = 0,42$ und $p = 0,001$ bei einem Alpha-Niveau von 0,05 eine statistisch signifikante Korrelation (da der p-Wert kleiner als 0,05 ist, Abb. 18B). Die signifikante Korrelation zeigt sich in Abb. 18B rechts darin, dass in diesem Fall die beobachtete Verteilung stark von der Verteilung der Nullhypothese abweicht (aus den Matrizen berechneter Korrelations- und p-Wert, roter Pfeil) und damit die Annahme der Nullhypothese widerlegt wird. Mit anderen Worten, es besteht eine signifikante Korrelation zwischen den Matrizen A und B. Die hier berechnete Korrelation der deutschen CLRV-Isolate von 0,42 (42%) ähnelt zudem sehr dem G_{ST} -Koeffizienten mit 0,387 (39%), der alle in dieser Arbeit untersuchten CLRV-Isolate beinhaltet.

Um einen partiellen Mantel-Test unter Einbeziehung aller drei Matrizen durchzuführen, wird gefordert, dass beide Matrizen (Wirtspflanze und geographischer Abstand) Einfluss auf die genetische Diversität ausüben, um zu testen, welche der beiden Größen den größeren Einfluss besitzt. Dies erübrigt sich hier, da die geographischen Distanzen der 41 deutschen CLRV-Isolate keinen Einfluss auf die genetische Distanz der CLRV-Populationen haben.

Erstaunlich ist jedoch, dass obwohl beim Vergleich aller 41 Original-Wirtspflanzenarten unterschiedlicher Arten nachweislich keine Korrelation zwischen der genetischen und der geographischen Distanz besteht, dieses Ergebnis bei ausschließlicher Betrachtung der Verhältnisse für die 18 Holunder-Isolate aus Deutschland widerlegt wird. Mit einer Korrelationskonstante von $r(A,C) = 0,598$ und dem Wahrscheinlichkeitswert von $p = 0,0001$ besteht bei einem alpha-Wert von 0,05 eine signifikante Korrelation zwischen der genetischen und geographischen Distanz innerhalb Deutschlands (Abb. 18C).

3.16 Vergleich der viralen RNA-Sekundärstruktur der 3'UTR von CLR V

RNA-Moleküle können eine definierte Sekundärstruktur aufweisen. Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNA-Molekülen können an verschiedenen Prozessen wie z. B. der Translations- und Replikationskontrolle beteiligt sein, die Voraussetzung für die Bildung von Reaktionszentren darstellen oder mit Proteinen bzw. Enzymen interagieren. Durch komplementäre Basenpaarungen führen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen der Ribonukleotidbasen zur Faltung des RNA-Moleküls. Faltungen können einen energetisch stabilen Zustand darstellen und eine funktionelle Bedeutung besitzen. Um mögliche konservierte Strukturbereiche zu identifizieren, wurde eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt (2.23). Die Analyse der Sekundärstruktur kann erste Hinweise auf die Funktion von RNAs bieten.

Es wurde zunächst anhand von den minimale freie Energie (mfe)-Strukturwerten und Basenpaarwahrscheinlichkeitsberechnungen eine Konsensussequenz aller 67 CLR V-Sequenzen der 3'UTR erstellt und diese auf konservierte Bereiche hin untersucht. Zur Analyse der Sekundärstruktur der 67 Sequenzen mit einer Länge von 380 bp wurde ClustalX 1.8 und das Vienna RNA Package verwendet (2.23).

In Abb. 19 wurde die Konsensussekundärstruktur der 67 CLR V-Sequenzen dargestellt. Diese Struktur zeigt eine Vielzahl von Stemloops und eine Reihe kompensatorischer, aufeinander folgender Basenaustausche (Kreise) innerhalb der Stem-Strukturen.

Besonders auffällig innerhalb der Konsensus-Struktur der 3'UTR aller 67 CLR V-Isolate ist ein Stemloop, der fünf aufeinander folgende kompensatorische Basenpaare aufweist (Base 175 bis 198). Dieser befindet sich in Abb. 19 (1) ganz unten im Bild und wurde rot markiert. Mutationen an dieser Position treten hier nur in Kombination mit Mutationen an der komplementären Position des Stems auf, so dass der Stemloop bei allen verglichenen Isolaten intakt bleibt. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Sekundärstruktur dieses Stemloops eine wichtige Funktion besitzt. Auch der kleine nach links weisende Stemloop (Abb. 19 (2), linke rote Markierung, Base 127 bis 145) mit zwei aufeinander folgenden

kompensatorischen Basen könnte eine Funktion besitzen. Der visuelle Vergleich aller Postscript-Dateien der 67 Sequenzen zeigt, dass beide Stemloops mal etwas ausgeprägter und länger, und manchmal etwas kürzer bei einzelnen CLRV-Isolaten auftreten, jedoch immer erhalten bleiben. Einige ausgewählte Beispiele von RNA-Sekundärstrukturen verschiedener CLRV-Sequenzen wurden in Abb. A6 im Anhang dargestellt.

In Abb. 20 wird ein Mountain Plot für die 380 bp lange Konsensussequenz dargestellt. In dieser Grafik lassen sich die auf eine wichtige funktionelle Bedeutung der vorhergesagten Sekundärstruktur hinweisenden kompensatorischen Basenaustausche ebenfalls anhand der grünen und ockerfarbenen Querbalken verifizieren (für Details zur Interpretation der Darstellung siehe 2.23).

Ein detaillierter Vergleich des Ausschnitts von Basenposition 175 bis 198 innerhalb der Konsensussequenz der 3'UTR, der den Stemloop der fünf aufeinander folgenden kompensatorischen Basenpaare charakterisiert, ergibt weitere deutliche Hinweise für die Bedeutung dieser Sekundärstruktur. Abb. 21B zeigt die Sekundärstruktur der Konsensussequenz aller 67 CLRV-Isolate im Bereich von Base 175 bis 198. Die konservierten Bereiche, die sich im Schaubild der 380 bp langen Konsensussequenz erkennen lassen, können auch in dieser Darstellung wieder gefunden werden. Abb. 21A zeigt den Mountain Plot für diesen Sequenzbereich, der einen Ausschnitt aus Abb. 20 darstellt, und Abb. 21C den Bereich unter der Diagonale der Dreiecksmatrix des Dot Plots für diesen Bereich (für Details zur Interpretation der Darstellungen siehe 2.23). Auch im Dot Plot wird anhand der grünen und ockerfarbenen aufeinander folgenden Punkte im Diagramm die starke Konservierung der aufeinander folgenden kompensatorischen Basenpaarungen des großen Stemloops an der Basenposition 175 bis 198 und des kleinen konservierten Stemloops an Basenposition 127 bis 145 verifiziert.

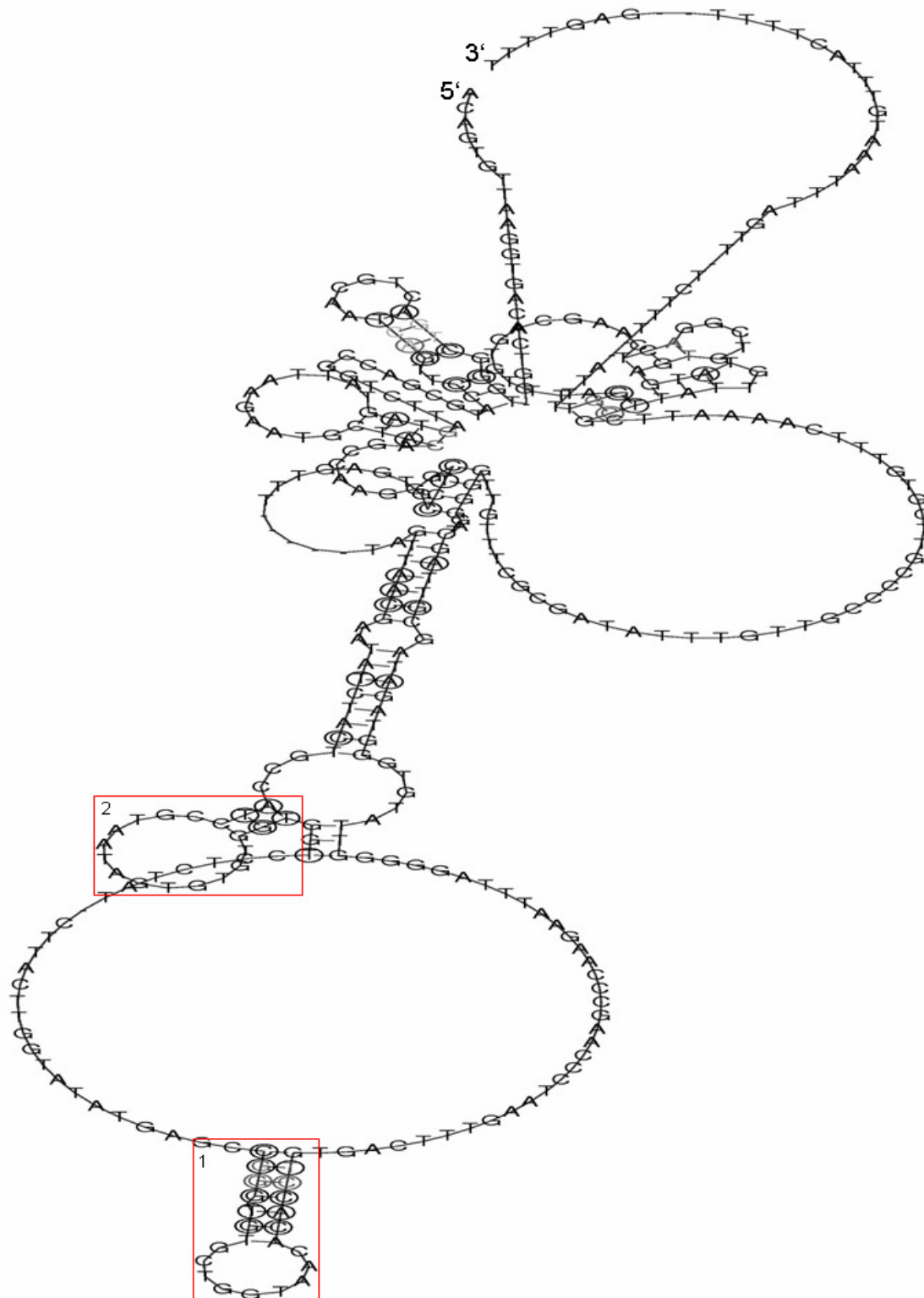


Abb. 19: Sekundärstruktur der Konsensussequenz aus 67 CLRV-Sequenzen einer Länge von 380 bp innerhalb der 3'UTR.

Die konstanten Basenpaare sind durch eine schwarze Kreismarkierung der Base in den Abbildungen gekennzeichnet. Basenpaarungen sind grau hinterlegt, wenn nicht nur kompensatorische, sondern auch inkompatible Austausche an dieser Stelle auftauchen. Die Farbsättigung einer Base gibt Auskunft über die Häufigkeit inkompatibler Basenpaarungen des Sequenzvergleichs an dieser Stelle. Ist nur eine Base eines Basenpaars in einem Stenloop umrandet, wird gezeigt, dass an dieser Stelle verschiedene nicht kompatible Basen auftauchen und die Erhaltung der Basenpaarung oder des Stenloops nicht gesichert ist (2.23). Die rot umrandeten Basen kennzeichnen die Stenloops konservierter Bereiche (1: 175 bis 198; 2: Base 127 bis 145).

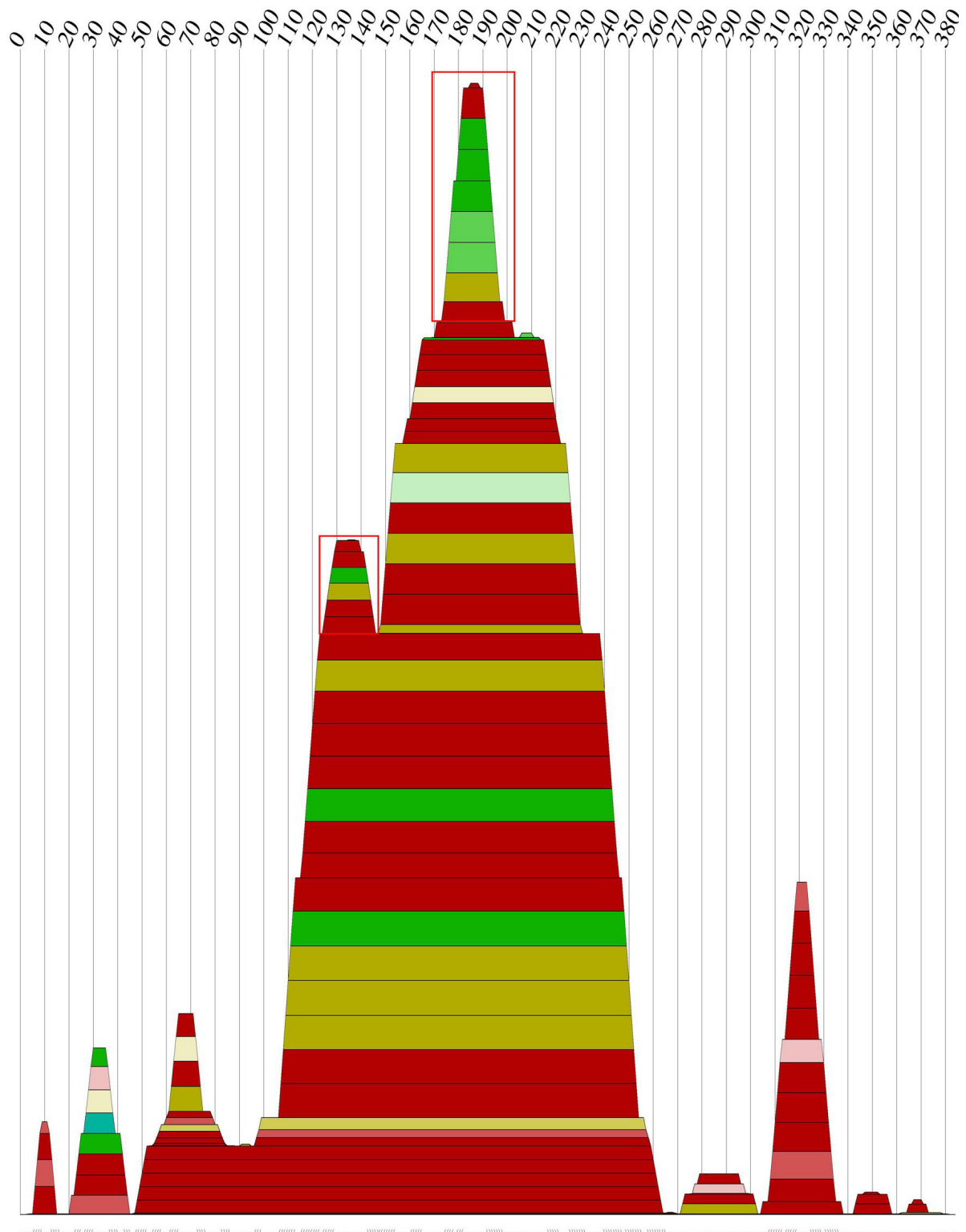


Abb. 20: Mountain Plot der 380 bp langen Konsensussequenz innerhalb der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region des CLRV-Genoms erstellt mit ClustalX und Vienna RNA Package.

x-Achse: Basenposition, y-Achse: Anzahl von Basenpaarungen. Loops werden im Diagramm durch Plateaus beschrieben, gepaarte Bereiche durch positive und negative Steigungen. Je höher und breiter die Erhebung erscheint, desto länger ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der Konsensussequenz. Die farbigen Querbalken im Diagramm korrespondieren mit je einer Basenpaarung der Konsensussequenz. Grüne und im speziellen blaue Farben zeigen das Auftreten kompensatorischer Mutationen und sind daher das Auswahlkriterium zur Identifizierung von konservierten Bereichen mit potenziell funktioneller Bedeutung. Rot bedeutet identische Basen in allen Sequenzen (keine Sequenz-Variation). Die rot umrandeten Basen kennzeichnen die Stemloops konservierter Bereiche (1: 175 bis 198; 2: Base 126 bis 145).

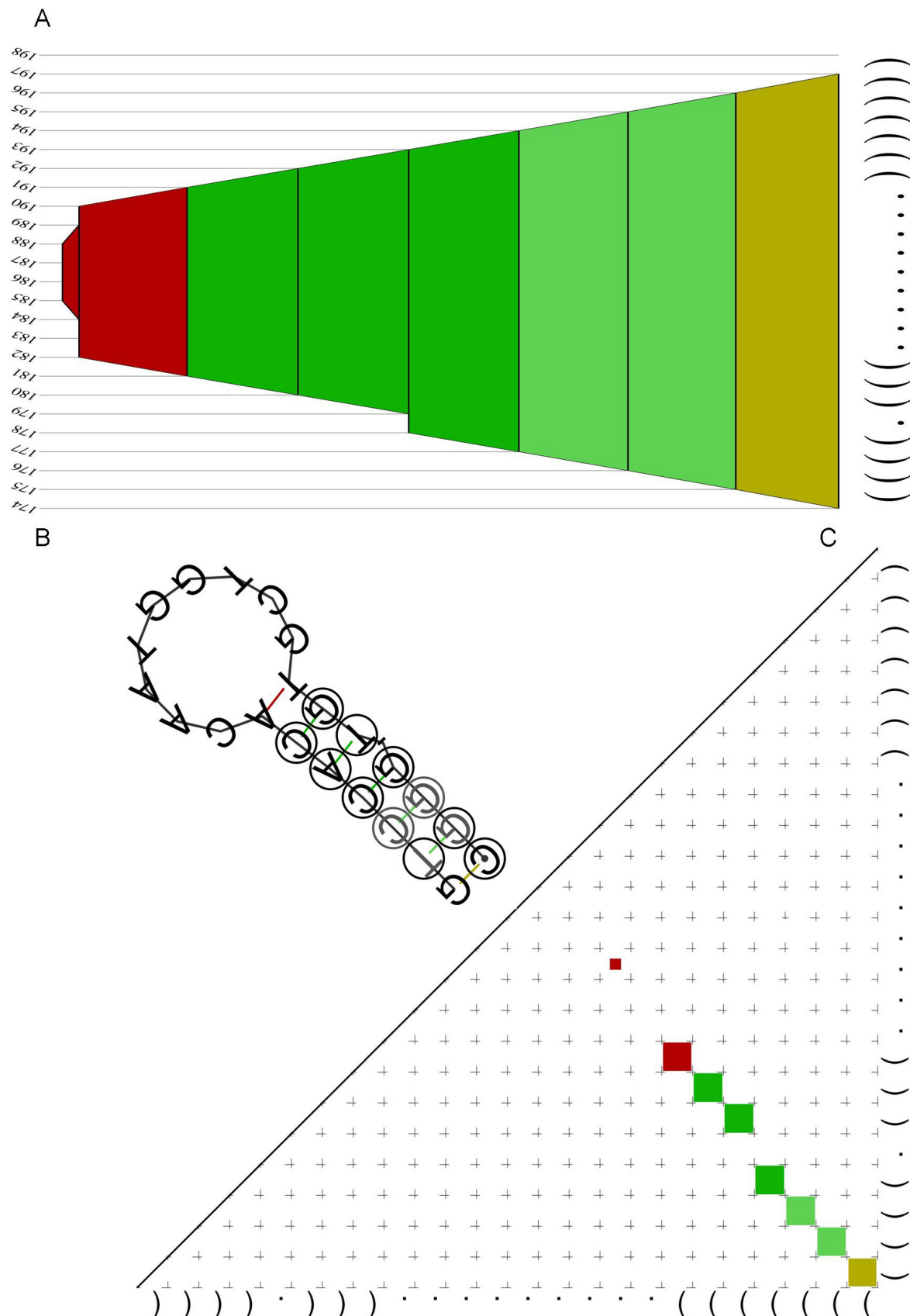


Abb. 21: Sekundärstrukturanalyse der 23 bp langen Konsensussequenz innerhalb der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region des CLRV-Genoms erstellt mit ClustalX und Vienna RNA Package.

A) Mountain Plot der 23 bp langen Konsensussequenz des Teilbereiches von 174 bis 196 Basen, B) Sekundärstruktur der Konsensussequenz des Teilbereiches von 174 bis 196 Basen C) Dot Plot des Teilbereiches von 174 bis 196 Basen.

3.17 Serologischer Vergleich von CLRV-Isolaten mittels mAb-Analyse

Die Reaktion zwischen Virus und monoklonalem Antikörper ist vom viralen Strukturprotein (Hüllprotein) abhängig. Die Hüllproteinstruktur spielt bei der Übertragung von Viren sowie bei der Interaktion zwischen Virus und Wirt eine entscheidende Rolle (CALLAWAY *et al.*, 2001). Das Virus-Hüllprotein unterliegt einem mehr oder weniger starken Anpassungsdruck, der durch epidemiologische Faktoren bestimmt wird. Jeder monoklonale Antikörper weist jeweils nur eine spezifische Rezeptor-Bindestelle auf, die nicht bei allen Virusisolaten vorhanden sein muss. Daher können monoklonale Antikörper effektiv zur serologischen Differenzierung von Virusisolaten eingesetzt werden.

Es sollte untersucht werden, inwieweit sich die CLRV-Isolate mittels der eingesetzten monoklonalen Antikörper unterscheiden lassen und ob sich eine ähnliche Gruppierung widerspiegelt, wie es der Vergleich der Sequenzen im 3'-terminalen nicht-kodierenden Genombereich (3.10) und der Hüllprotein-Aminosäuresequenzen (3.11) des CLRV zeigte. In Zusammenarbeit mit Dr. T. Candresse (UMR GD2P, INRA et Université Bordeaux 2, IBVM, Villenave d'Ornon, Frankreich) wurden alle in dieser Arbeit erhaltenen Isolate, die sich auf krautige Testpflanzen übertragen ließen, unter der Verwendung von sieben monoklonalen Antikörpern (mAb), die gegen ein französisches Walnuss-Isolat (CTIFL) hergestellt wurden, von der Arbeitsgruppe von Dr. T. Candresse in Frankreich auf die serologische Variabilität von CLRV untersucht. Die verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in Frankreich durch Injektion von aufgereinigten CLRV-Partikeln des CTIFL-Walnuss-Isolats in BALB/c-Mäuse aus sezernierenden Hybridomzellen (Hybridomatechnik) nach DESBIEZ *et al.* (1996) aufgereinigt. Die Antikörperproduktion der Hybridomzellen wurde mittels Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA) überprüft. Durch anschließende Selektion, Klonierung und Reklonierung in mehreren Passagen konnten verschiedene mAbs identifiziert und isoliert werden.

Insgesamt wurden sieben verschiedene, gegen das CTIFL Walnuss-Isolat produzierte, mAbs (gekennzeichnet mit 1.21, 2.28, 3.29, 3.9, 5.24, 7.26 und 9.16) im TAS-ELISA auf ihre Reaktivität mit 24 CLRV-Isolaten getestet, die in *Chenopodium quinoa*-Indikatorpflanzen vermehrt werden konnten. Die getesteten Isolate sind Mitglieder aus den fünf verschiedenen phylogenetischen Gruppen Holunder, Walnuss, Süßkirsche, Himbeere und Rhabarber, die in Kapitel 3.10 beschrieben wurden. Zur Kontrolle wurde ein polyklonales Antiserum, das auch gegen das Walnuss-CTIFL-Isolat produziert wurde, im DAS-ELISA eingesetzt (CLARK & ADAMS, 1977). Es wurden Unterschiede in der Reaktivität der Isolate mit den monoklonalen und dem polyklonalen Antikörper beobachtet (Tab. 10). Mit Hilfe des polyklonalen Antiserums (pAb) gegen das Walnuss-CTIFL-Isolat lassen sich zwei Isolatgruppen auf der

Grundlage der Extinktionswerte im ELISA unterscheiden: eine Isolatgruppe ergab durchweg niedrige ELISA Messwerte ($OD < 0,3$), wohingegen die zweite Isolatgruppe, unter gleichen Testbedingungen, generell wesentlich höhere OD-Werte ($OD > 1,0$) aufwies. Eine größere Differenzierung ergab der Vergleich der sieben monoklonalen Antikörper. In keinem anderen Fall reagierte hierbei ein monoklonaler Antikörper mit allen geprüften Isolaten. Insgesamt konnten die 24 Isolate im serologischen Vergleich mittels der mAb-Analyse in 4 Serogruppen unterschieden werden.

Tab. 10: Reaktivität von 24 CLRV-Isolaten im TAS-ELISA unter der Verwendung von 7 monoklonalen Antikörpern.

Isolat- bezeichnung	Serologische Reaktion mit								Serogruppe
	pAb	mAb 3.29	mAb 3.9	mAb 1.21	mAb 2.28	mAb 5.24	mAb 7.26	mAb 9.16	
Süßkirsche-E327	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	1
Süßkirsche-E1472	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
Sand-Birke-E1469	+/-	+	+	+	-	-	-	-	
Sand-Birke-E120	+/-	+	+	+	+	-	-	-	
Sand-Birke-E111	+/-	+	+	+	+	-	-	-	
Sand-Birke-E441	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-	-	
Sand-Birke-E806	+/-	+	+	+	+/-	-	-	-	
Walnuss-CTIFL	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	3
Walnuss-4Wjug	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	
Walnuss-E326	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	
Walnuss-GAY	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	
Walnuss-Ludmila	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	
Holunder-PV-0276	+	-	-	-	-	+	+	+	4
Holunder-E492	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E568	+	-	-	-	-	+	+	+	
Eberesche-E693	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E485	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E603	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E443	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E583	+	-	-	-	-	+	+	+	
Holunder-E576	+	-	-	-	-	+	+	+	
Himbeere-E802	+	-	-	-	-	-	-	+	2
K. Holunder-E804	+	-	-	-	-	-	-	+	
Rhabarber-E395	+	-	-	-	-	-	-	+/-	

Reaktivität mit pAb: - keine Reaktion, +/- kennzeichnet einen OD-Wert unter 0,3 (hellgrün), + kennzeichnet einen OD-Wert zwischen 0,6-0,8 (dunkelgrün). Reaktivität mit mAbs: - keine Reaktion, +/- kennzeichnet einen OD-Wert unter 50 % des OD-Werts der pAb (rosa), + kennzeichnet einen OD-Wert über 50 % des OD-Werts der pAb (orange).

Alle untersuchten Walnuss-Isolate aus Deutschland, Großbritannien, Slowakei und Frankreich, einschließlich des CTIFL-Isolats, das für die Immunisierung verwendet wurde, reagierten mit allen sieben mAbs und entsprechen der mAbs Serogruppe 3. Demgegenüber zeigten alle anderen Isolate mit mindestens einem oder mehreren mAbs eine negative Reaktion. Serogruppe 4 wird durch positive Reaktionen mit mAb 5.24, 7.26 und 9.16 gekennzeichnet und beinhaltet eine große Zahl von Holunder-Isolaten (PV-0276, E492, E568, E485, E576, E603, E583 und E443) zusammen mit einem Ebereschen-Isolat (E693). Die Serogruppe 1 besteht aus einer Gruppe von 7 Isolaten, die Isolate verschiedener Wirtspflanzen beinhaltet und eine allgemein niedrigere Reaktivität mit dem polyklonalen Antikörper zeigt (Tab. 10). Diese heterogene Gruppe weist eine positive Reaktion mit den mAbs 3.29 und 3.9, aber nicht mit den mAbs 5.24, 7.26 und 9.16 auf und konnte weiter in mindestens drei Untergruppen unterteilt werden, die durch verschiedene Reaktionen der einzelnen Isolate mit den mAbs 1.21 und 2.28 definiert wurden. Drei Isolate (E395, E802 und E804) wurden nur vom mAb 9.16 erkannt, und wurden hierauf beruhend als Serogruppe 2 definiert (Tab. 10).

3.18 Vergleich der serologischen und molekularen Ergebnisse

Aufgrund der phylogenetischen Gruppierung, basierend auf den 3'-terminalen Sequenzen des CLRV-Genoms (3.10), und der unterschiedlichen serologischen Reaktivität mittels mAb-Analyse der untersuchten CLRV-Isolate (3.17), sollte geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den serologischen und molekularen Ergebnissen besteht.

Aus der Abb. 22 wird deutlich, dass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Serogruppen und den phylogenetischen Gruppen existiert. Die phylogenetischen Gruppen A (Süßkirsche) und E (Holunder) entsprechen genau den Serogruppen 1 und 4. Die phylogenetische Gruppe D (Walnuss) zeigt eine Ähnlichkeit mit der Serogruppe 3, während die zwei kleinen phylogenetischen Gruppen C (Himbeere) und B (Rhabarber) zusammen in die Serogruppe 2 fallen. Es scheint nur eine einzelne Ausnahme zu dieser übereinstimmenden serologischen und molekularen Gruppierung der Isolate zu geben: das Kanadische Holunder-Isolat E804 wird in die phylogenetische Holunder-Gruppe E eingestuft, besitzt aber die gleiche serologische Reaktivität, wie die Isolate E802 (phylogenetische Gruppe C) und E395 (phylogenetische Gruppe B). Die Serogruppen innerhalb der Gruppe 1 unterscheiden sich leicht voneinander und wurden daher zusätzlich in die Gruppen 1a, 1b und 1c unterteilt. Die Serogruppe 1a beinhaltet beide Süßkirschen-Isolate, die mit den mAb 3,29 und 3,9 reagierten, die Serogruppe 1b besteht aus sechs Isolatsequenzen (vier Isolate aus Sand-Birke, ein Isolat aus Schwarzem Holunder und ein Isolat aus Gemeiner Esche), die alle eine positive Reaktion mit den mAbs 3,29, 3,9, 1,21 und 2,28 aufweisen. Die Serogruppe 1c beinhaltet nur ein Isolat, das als einziges Isolat mit den mAbs 3,29, 3,9 und 1,21 reagierte.

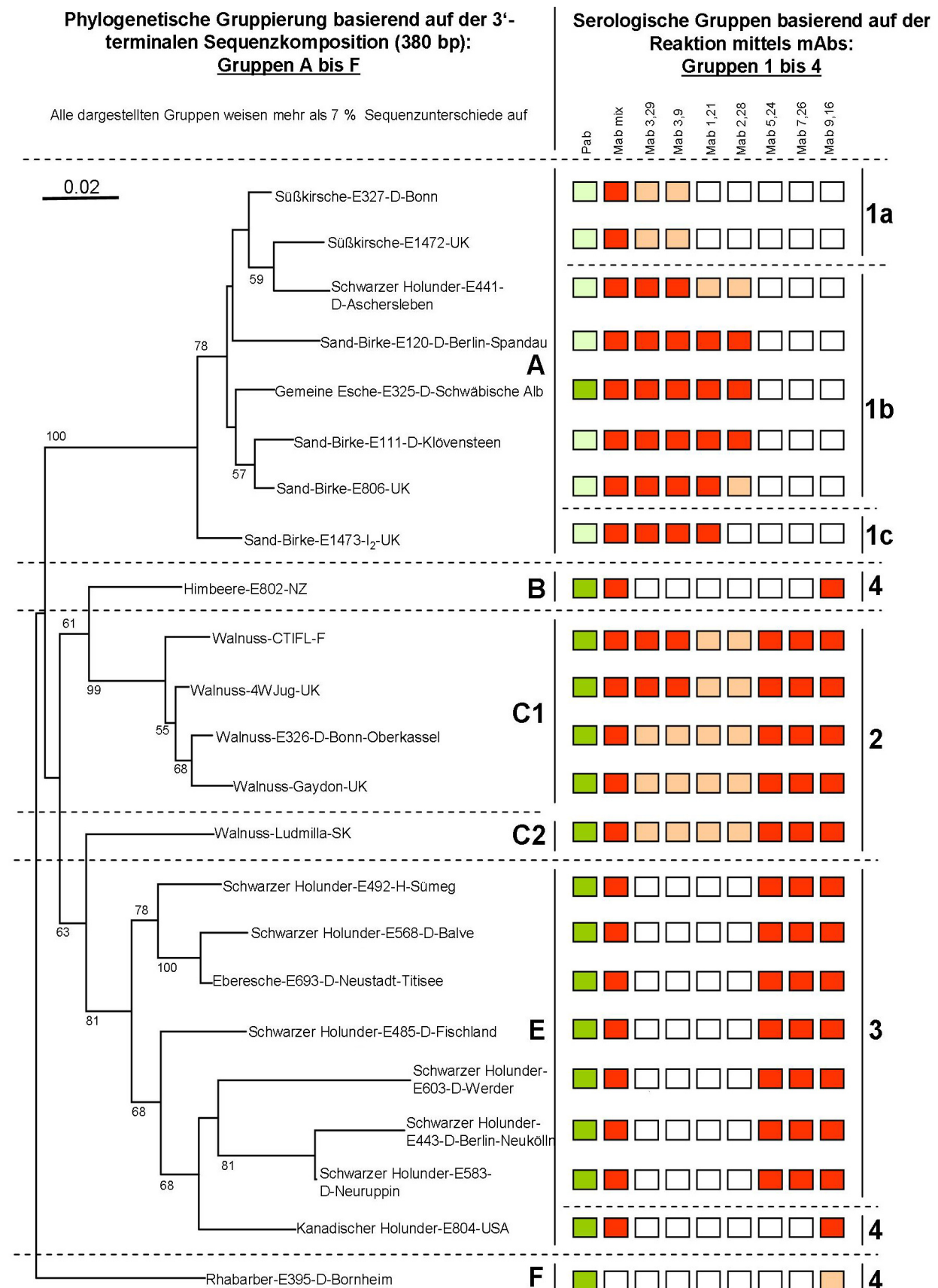


Abb. 22: Vergleich der Ergebnisse der mAb-Analyse unter Verwendung von einem polyklonalen (pAb) und sieben monoklonalem Antikörpern (mAbs), produziert gegen das Walnuss-CTIFL-Isolat aus Frankreich, mit dem phylogenetischen Stammbaum nach Analyse 380 bp langer Sequenzabschnitte innerhalb der 3'UTR des CLRV-Genoms.

4 Diskussion

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist ein weltweit verbreitetes Pflanzenvirus, das Laubgehölze und Stauden natürlich infiziert (JONES, 1985). CLRV ist bislang das einzige bekannte Pflanzenvirus, das solch einen weiten Wirtspflanzenkreis an Gehölzen aufweist. Die Grundlagen der enormen Anpassungsfähigkeit dieses Virus an verschiedene Wirtspflanzen und Umweltbedingungen sind bisher ungeklärt. Dies sowie die fehlenden Informationen zum Einfluss des Wirtspflanzenkreises und der geographischen Herkunft von CLRV-Populationen zur genetischen und serologischen Diversität und zur Koevolution von Wirtspflanzen und Virus waren Anlass für die Untersuchungen dieser Arbeit.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der reproduktiven evolutionären Fitness von Viren und dem Grad an Virulenz (ZHAN *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 1992; SANJUAN *et al.*, 2004). Die Virulenz wird als treibende Kraft der Wirt-Virus-Koevolution angesehen. Der Erhalt bzw. die Entwicklung einer hohen Reproduktionsrate ist dabei die unvermeidbare Reaktion des Virus, um seine Virulenz zu erhalten. Dies erfordert wiederum eine gute Anpassung an die Wirtszelle (DE JONG, 1994). Das Potenzial für die genetische Flexibilität von Pflanzenviren hängt in der Regel von der Fähigkeit des Virus zum genetischen Austausch durch Rekombination oder zur Selektion bestimmter Genombereiche ab (QI & DING, 2002). Dadurch wird der Grad an Diversität der Viruspopulation bestimmt. Faktoren, wie beispielsweise die Interaktion des Virus mit der Wirtspflanze (NOUEIRY & AHLQUIST, 2003) und Vektoren, die Demographie und die genetische Struktur der Wirtspflanze oder auch die zufällige genetische Drift und die Zeit, können auf die Viruspopulation einwirken, durch Selektion zur genetischen Differenzierung führen und so die Virulenz beeinflussen. Wenn die Entwicklung schneller in den Pathogenpopulationen als in den Wirtspopulationen voranschreitet, führt dies langfristig zur lokalen Anpassung der Viruspopulation. Wirtspflanzen-Genotypen können eine starke Auswirkung auf die Dynamik der Viruspopulationen besitzen. Die Verteilung bzw. Diversität ist dabei abhängig von der Virus-Wirt-Kombination (ROOSSNICK, 1997). Welche Heterogenität CLRV-Populationen aufweisen und welche Prozesse und Faktoren auf CLRV-Populationen einwirken, in welchem Zeitraum Veränderungen ablaufen können und woraus die hohe Flexibilität des CLRV im Speziellen resultiert, ist bislang nicht bekannt. Einige dieser Faktoren zur Virus-Wirt-Adaption und Epidemiologie wurden in dieser Arbeit untersucht und sind nachfolgend beschrieben.

4.1 Verbreitung und biologische Diversität

Es wurden zunächst Probenahmen in verschiedenen Regionen Deutschlands durchgeführt (3.1) und Gehölze und Stauden mit virusverdächtigen Blattsymptomen mittels IC-RT-PCR,

Transmissionselektronenmikroskopie und Biotest auf Infektionen mit CLRV untersucht.

Das für die IC-RT-PCR-Verfahren angewandte Primerpaar wurde aus den Sequenzen von fünf CLRV-Birken-Isolaten von WERNER *et al.* (1997) abgeleitet. Das von WERNER *et al.* (1997) entwickelte IC-RT-PCR-Verfahren wurde für die vorliegende Arbeit modifiziert (2.10). In der Immunocapture wurde ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, der gegen ein CLRV-Eschen-Isolat hergestellt wurde und eine breite Reaktivität besitzt. Mittels IC-RT-PCR konnte CLRV in 17 verschiedenen Gehölzarten nachgewiesen werden. Somit war dieses Verfahren gut geeignet, CLRV-Infektionen in einer großen Zahl unterschiedlicher natürlicher Wirte nachzuweisen, obwohl die Primersequenzen ausschließlich von CLRV-Birken-Isolatsequenzen abgeleitet wurden. Die hohe Empfindlichkeit und Eignung von IC-RT-PCR Verfahren zur Routine-Diagnose von Pflanzenkrankheiten ist in den letzten Jahren von einer großen Zahl von Autoren dokumentiert worden (MARTIN *et al.*, 2000). Aufbauend auf dem empfindlichen angepassten IC-RT-PCR-Verfahren, das in den vorliegenden Untersuchungen für alle Proben verwendet wurde, wurde zusätzlich ein vereinfachtes IC-RT-PCR-Verfahren zum Nachweis einer großen Anzahl von infizierten Gehölzen im Freiland für zukünftige epidemiologische Studien entwickelt (3.6).

Durch die Testung von Proben verschiedener Standorte mittels biologischer und molekularer Verfahren konnte die deutschlandweite Verbreitung von CLRV nachgewiesen werden (3.1). Als häufigste Wirtspflanzen des CLRV unter den bekannten Wirtspflanzen in Deutschland wurden Sand-Birke und Schwarzer Holunder identifiziert. Dabei ist zu beachten, dass keine zufälligen Probenahmen an symptomlosen Arten aus einem weiten Artenspektrum in ganz Deutschland erfolgten, sondern Proben hauptsächlich von Pflanzenarten mit virusverdächtigen Symptomen gesammelt wurden, die in der Literatur bereits als CLRV-Wirtspflanzen beschrieben wurden. Einige bisher nicht in der Literatur als natürlicher Wirt des CLRV beschriebene Pflanzenarten wurden getestet, wenn sie virusverdächtige Symptome aufwiesen und in der Nähe von CLRV-Wirtspflanzen auftraten. Das Vorkommen von CLRV in anderen dokumentierten und getesteten Wirtspflanzen (außer Holunder und Birke) in Deutschland scheint eher vereinzelt zu sein. Die hier beschriebenen Untersuchungen ergänzen den bislang bekannten Verbreitungsraum des CLRV.

Anhand der Symptombonituren konnte die Variabilität der Symptomausprägungen erfasst werden, die das CLRV an den verschiedenen natürlichen Wirtspflanzen hervorruft. Die Symptome variierten in Abhängigkeit von der Wirtspflanze von unscheinbar über verschiedene Formen an Blattchlorosen bis hin zu Blattnekrosen und Absterben ganzer Pflanzenbereiche (3.2) Diese Ergebnisse stimmen mit den Berichten einer Reihe von Autoren zu den Symptomausprägungen bei verschiedenen CLRV-infizierten Wirten überein

(z.B. SCHUSTER & MILLER, 1933; CROPLEY, 1961; SCHMELZER, 1966; MAYHEW & EPSTEIN, 1971; FORD *et al.*, 1972; SCHMELZER, 1972a; WATERWORTH & LAWSON, 1973; HORVÁTH *et al.*, 1974; COOPER & ATKINSON, 1975; SCHIMANSKI *et al.*, 1975a; QUAQUARELLI & SAVINO, 1977; SAVINO *et al.*, 1977; COOPER & EDWARDS, 1980; GIERSEPPEN, 1993; QUADT, 1994). Die Ursachen für die große Variabilität und das Ausmaß der Symptomausprägung bei Virusinfektionen von Pflanzen im jeweiligen spezifischen Wirt beruhen auf komplexen intrazellulären und interzellulären Interaktionen zwischen Wirtspflanze und Virus. Diese Interaktionen sind wiederum stark von den spezifischen Standortfaktoren abhängig. Zytologische Veränderungen nach einer Virusinfektion sind Ausdruck für die Wechselwirkung von Teilen des Virusgenoms mit der Wirtspflanzenzelle. Man unterscheidet allgemein zwischen unspezifischen und spezifischen Veränderungen der Pflanzenzelle. Unspezifische Veränderungen sind bei allen Virusinfektionen ähnlich und beruhen auf dem Verbrauch von Ressourcen für die Synthese viraler Nukleinsäuren und Proteine oder auf dem störenden Einfluss virusspezifischer Produkte auf die zellulären Prozesse, was sich beispielsweise durch Verkleinerung der Zellengröße und durch Reduzierung der Chloroplastenzahlen äußert. Die spezifischen Veränderungen sind hingegen für verschiedene Kombinationen von Virus- und Wirt-Genotypen stark variabel. Dies kann zu großen Unterschieden in der Symptomausprägung führen. Das Konzept der Gen-für-Gen-Interaktion für Pflanze-Pathogen-Systeme, einschließlich Viren, Bakterien und Pilze, beschreibt diese Prozesse (CRUTE *et al.*, 1997). Ein bekanntes Beispiel für die Gen-für-Gen-Interaktion ist die hypersensitive Reaktion der Tabakpflanze, die durch das N-Resistenzgen hervorgerufen wird, das eine Resistenz gegenüber *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) vermittelt. Dieses Gen kommt nicht in allen Tabaklinien vor, und verdeutlicht, dass diese Reaktion der Pflanze auf die TMV-Infektion vom Genotyp der *Nicotiana*-Varianten abhängig ist. Auch die Art der Stressinduktion steht in Abhängigkeit von der Interaktion von TMV-Proteinen mit der Pflanzenzelle und ist ein weiteres Beispiel für Gen-für-Gen-Interaktionen (SCHOLTHOF, 2004). Die unterschiedlichen Reaktionen des Tabaks auf verschiedene TMV-Isolate zeigt, wie das Genom der Pflanzenzelle mit dem Virus interagiert und wie unterschiedlich die Symptomausprägungen bei verschiedenen Isolaten oder Pathotypen des gleichen Virus bzw. bei verschiedenen Pflanzen-Genotypen sein können. Die zytologischen Veränderungen, die eine CLRV-Infektion in seinen natürlichen Wirtspflanzen hervorruft, wurde bei CLRV-infizierten Birken, Walnussbäumen, Rot-Buchen und Gemeinen Eschen untersucht (COOPER & ATKINSON, 1975; DE ZOETEN *et al.*, 1982; GIERSEPPEN, 1993; HAMACHER & QUADT, 1991; MARTELLI, 1980; MASSALSKI & COOPER, 1984; WALKEY & WEBB, 1968; WALKEY & WEBB, 1970). Auch hierbei zeigten sich Unterschiede je nach Virus/Wirt-System. Beispielsweise konnten die für CLRV-infizierte Birkenblätter beschriebene Akkumulation von Tanninen und die Hyperplasie im Schwammparenchym und in mäandrierenden Leitbündeln der Epidermis in CLRV-infizierten Eschenblättern nicht nachgewiesen werden (HAMACHER & QUADT, 1991;

GIERSEPEN, 1993). Auch das Auftreten von CLRV in Tubuli ist wirtsspezifisch (WALKEY & WEBB, 1968; WALKEY & WEBB, 1970). Die Unterschiede der sichtbaren zytologischen Veränderungen in verschiedenen Wirtspflanzenarten, die durch eine Infektion mit CLRV induziert wird, geben Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen Symptomausprägung. Die biochemischen und molekularen Wechselwirkungen in Bezug auf das Entwicklungsstadium von Virus und Pflanzenzelle sind im Detail bislang nicht aufgeklärt. Es gilt jedoch allgemein, dass die Intensität der Symptomausprägung einer kompatiblen Wirt/Virus-Kombination mit dem Ausmaß der Virusreplikation und Virusakkumulation korreliert (REVERS *et al.*, 1999). Wichtige Einflussfaktoren, die zur Modifikation der Symptomausprägungen führen können, sind dabei der Virus-Stamm sowie die Standortbedingungen, die Physiologie und der Entwicklungsstand der Wirtspflanze (ZAITLIN & HULL, 1987). Die Individualität des Virus/Wirt-Systems, die wiederum unter verschiedenen Umwelteinflüssen stehen und die Art und Stärke der Symptomausprägungen beeinflussen können, macht die Erkennung einer CLRV-Infektion allein anhand der Symptome daher oftmals schwierig.

Die Untersuchungen von Adsorptionspräparaten mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigten sich zur generellen Diagnose von CLRV-Infektionen in Gehölzen in Routinetestverfahren als ungeeignet. Hingegen ist die TEM-Diagnose zur Untersuchung von Gehölzproben und im Besonderen von Indikatorpflanzen auf Mischinfektionen mit morphologisch anderen Viren gut geeignet (3.4). In 36 % aller mittels TEM untersuchten CLRV-infizierten Proben konnte eine Mischinfektion von CLRV mit filamentösen Viren festgestellt werden (3.4). Das Vorkommen von CLRV und anderen Viren in Mischinfektionen wurde bislang nur wenig in der Literatur beschrieben. Im Rahmen der diesen Untersuchungen vorangestellten Diplomarbeit konnte eine Mischinfektion von *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV) und CLRV in einer Birkenprobe (E121) mittels DAS-ELISA nachgewiesen werden (REBENSTORF, 2002). GIERSEPEN (1993) beschreibt, dass die natürliche Infektion von *Betula pendula* mit ApMV sehr selten ist (0,4 %). Natürliche Infektionen von Birkenarten mit dem *Tobacco rattle tobavirus* (TRV, SCHMELZER, 1972a), *Tomato bushy stunt tombusvirus* (TBSV, NÓVÁK & LANZOVÁ), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV, POLÁK, 1990) oder *Prunus dwarf ilarvirus* (PDV, COOPER & MASSALSKI, 1984) wurden bereits in der Literatur beschrieben. Die transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben für Birken keine Hinweise auf Mischinfektionen von CLRV mit filamentösen oder stäbchenförmigen Viruspartikeln, wie z. B. TRV. Die Erkennung von isometrischen Viruspartikeln, wie TBSV, ArMV und PDV war auf Grund der ähnlichen Morphologie zu den Partikeln von CLRV nicht eindeutig möglich. Im Gegensatz dazu wurden in sechs für CLRV positiv getesteten Holunderproben Mischinfektionen mit flexiblen filamentösen Partikeln und in einer Probe eine Mischinfektion mit starren filamentösen Partikeln festgestellt. Die Länge

und die Form der flexiblen Partikeln (3.4) stimmte mit der morphologischen Beschreibung des *Elderberry carlavirus* (EV), das in England und Polen in Holunderpflanzen beschrieben wurde, überein (JONES, 1972, POLÁK *et al.*, 1990). Holunder-Infektionen mit anderen Viren ähnlicher morphologischer Eigenschaften, wie das EV, sind bislang nicht in der Literatur beschrieben. Die starren Stäbchen in der untersuchten Holunderprobe gleichen der Morphologie von Tobamoviren, zu denen auch TMV gehört, das von MUELLER (1967) in Holunder in den USA nachgewiesen wurde (bisher das einzige Virus mit dieser Morphologie). Die Erkennung von Mischinfektionen von CLRV mit *Tomato blackring nepovirus* (TBRV), *Tomato ringspot nepovirus* (TRSV), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Cucumis mosaic cucumovirus* (CMV), *Tomato bushy stunt tombusvirus* (TBSV), die auch Holunder infizieren können (SCHMELZER, 1966, POLÁK *et al.*, 1990), war aufgrund der ähnlichen Partikelmorphologie im Vergleich mit CLRV transmissionselektronenmikroskopisch nicht möglich. Es ist denkbar, dass ein transmissionselektronenmikroskopisches Verfahren, unter der Verwendung von Antikörpern (z. B. die Dekoration (DEKO) und die Immuno-Sorbent-Elektronenmikroskopie (ISEM)), die Empfindlichkeit dieses Verfahrens erhöht und zur generellen Diagnose besser geeignet ist.

Der Biotest mit Indikatorpflanzen (3.3) ergab, dass sich der Übertragungserfolg von Blatthomogenaten von Holunder und Birken, deren Blätter mittels IC-RT-PCR als CLRV-positiv getestet wurden, auf die Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa* deutlich unterscheiden kann (80 % bzw. 29 %). Eine erfolgreiche mechanische Übertragung des CLRV auf krautige Testpflanzen zur Vermehrung der CLRV-Varianten gelang ausschließlich mit frischem Blattmaterial aus *Sambucus nigra* und *Betula pendula* auf *Chenopodium quinoa*. Dies zeigt, dass die Übertragung von CLRV u. a. von dem Blattmaterial der jeweiligen Pflanzenart, dem Entwicklungsstand der Blätter und der Lagerung abhängt. Es ist bekannt, dass Tannine, Schleim- und andere Hemmstoffe, wie Polysaccharide und Flavonoide (WORMS & NIENHAUS, 1975), Proteine (FISCHER & NIENHAUS, 1973) und phenolische Verbindungen (FARKAS *et al.*, 1960) die Virusübertragung erschweren. Dabei ist der Gehalt der Stoffe abhängig von der Wirtspflanze. Schon beim Zermörsern des Blattmaterials von Sand-Birke und Schwarzem Holunder in Probenpuffer fällt auf, dass die Blätter der Sand-Birken wesentlich höhere Gehalte an Schleimstoffen aufweisen, als die Blätter des Schwarzen Holunders, die die Übertragung erschweren. Die Ursache für den geringen Übertragungserfolg voll entwickelter Blätter lässt sich möglicherweise auf die Konzentrationen an Hemmstoffen zurückführen, die in älteren Pflanzengewebe höher sein können als in jungem Gewebe. FULTON (1966) beschreibt dazu, dass Homogenate von virusinfizierten jungen Blättern, Blütenblättern, Pollen, Samen und manchmal auch Wurzeln von Gehölzen für eine erfolgreiche mechanische Übertragung auf Indikatorpflanzen besonders geeignet sind. Vergleichbare Beobachtungen machte auch SCHMELZER (1972a)

mit CLRV an infizierten Birken. Er zeigte, dass vor allem junge, noch nicht voll ergrünte Spitzenblätter der Birken bessere Übertragungserfolge erbringen als ausgewachsene Blätter und unterstützt damit die Vermutung. Der Übertragungserfolg scheint dagegen nicht auf den unterschiedlichen genetischen Eigenschaften der CLRV-Varianten, die Holunder- oder Birkenpflanzen infizieren, zu beruhen, da bei nachfolgender Übertragung der gewonnenen Isolate von *C. quinoa* auf *C. quinoa* keine deutlichen Unterschiede in der Symptomausprägung festzustellen waren.

Zum Vergleich der biologischen Eigenschaften des CLRV wurden alle CLRV-Isolate, die sich auf Testpflanzen übertragen ließen, auf verschiedene krautige Testpflanzen der Gattungen *Chenopodium* sp. und *Nicotiana* sp. abgerieben und die Symptomausprägungen bonitiert. Alle CLRV-Proben bzw. Isolate ließen sich auf die gleichen Biotestpflanzen übertragen und verursachten Symptome. Es konnten bei allen Isolaten einheitliche charakteristische Symptome bonitiert werden, die sich lediglich in ihrer Intensität unterschieden (3.3). Dabei ist zu vermuten, dass der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der eingesetzten Viruskonzentration steht, so dass sich biologische Unterschiede nur schwer voneinander differenzieren ließen. Auch JONES (1973) konnte beim biologischen Vergleich von vier CLRV-Isolaten (Kirsche-EC-216, Ulme, Kanadischer Holunder und Rhabarber) keine Unterschiede in Bezug auf die biologische Reaktion bei einer Infektion von verschiedenen *Chenopodium*- und *Nicotiana*-Arten feststellen. Im Gegensatz zu den eigenen und den Untersuchungsergebnissen von JONES (1973) wurden biologische Unterschiede zwischen verschiedenen CLRV-Isolaten von anderen Wissenschaftlern beschrieben. So lassen sich nach den Angaben dieser Autoren CLRV-Isolate in verschiedene biologische Serogruppen einteilen. GIERSEPEN (1993) beschreibt beispielsweise eine Unterteilung von 8 verschiedenen CLRV-Isolaten in drei verschiedene Biogruppen. CLRV-Isolate aus Birke, Kirsche, Esche und Buche bilden zusammen eine Gruppe. CLRV-Isolate aus Schwarzem Holunder, Walnuss und Rotem Holunder eine weitere und Rhabarber die Dritte. Das Hauptunterscheidungskriterium seiner Einteilung war dabei die reversible bzw. irreversible Schädigung von *Chenopodium quinoa*-Pflanzen. In vergleichenden biologischen Testungen zeigte auch TÓBIÁS (1995) Unterschiede zwischen Isolaten aus Walnuss, Kirsche, Himbeere und Holunder auf. Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist der Übertragungserfolg von CLRV-Isolaten auf *Gomphrena globosa* (JONES, 1973, JONES, 1976). Danach ließen sich die vier CLRV-Isolate (Kirsche-EC-216, Ulme, Kanadischer Holunder und Rhabarber) in zwei Gruppen einteilen (Kirsche-EC-216-Kanadischer Holunder und Ulme-Rhabarber). Alle beschriebenen Studien zeigen, dass die biologische Reaktion verschiedener CLRV-Isolate sehr variabel sein kann und eine laborübergreifende eindeutige Gruppierung von CLRV-Isolaten in Bio- oder Pathotypen daher sehr schwierig ist. So beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren möglicherweise nicht nur auf den Eigenschaften der

Isolate, sondern auch auf den spezifischen Standortbedingungen. Ebenso bestätigen die Ergebnisse dieser Studie, dass zur Differenzierung von Virusisolaten die Typisierung auf der Grundlage ihrer Wechselwirkung mit den üblicherweise verwendeten Indikatorpflanzen unzureichend und die Erschließung biochemischer, serologischer oder molekularer Methoden zur Isolatdifferenzierung unerlässlich ist.

Es zeigte sich, dass der Einsatz der IC-RT-PCR zwingend notwendig zur verlässlichen CLRV-Diagnose an Gehölzen ist. Die IC-RT-PCR-Analyse zeigte gegenüber Indikatorpflanzen-Analyse eine höhere Nachweis-Empfindlichkeit und reagierte unempfindlicher auf den Störeinfluss besonderer Inhaltsstoffe von Gehölzproben bei Verwendung von Blattproben verschiedener infizierter Pflanzenarten. Dies ist vermutlich auf die Bindung von Viruspartikeln an die Gefäßwand, das Herauswaschen von Hemmstoffen und die folgende Signalverstärkung durch die Amplifikationsreaktion der PCR zurückzuführen. Die CLRV-negativen Proben erwiesen sich auch in der TEM- und Indikatorpflanzen-Analyse als negativ. Trotz der hohen Empfindlichkeit der IC-RT-PCR zeigten sich aber nur 29 % (31/106) aller gesammelten Blattproben mit virus-typischen Symptomen von Gehölzen und Stauden als positiv für eine CLRV-Infektion. Daher ist zu vermuten, dass in der Mehrzahl der Fälle nicht CLRV-Infektionen, sondern andere biotische und abiotische Ursachen für die beobachteten Symptomausprägungen verantwortlich sind. Dies verdeutlicht, dass visuelle Bonitierungen allein unzureichend zur Diagnose von CLRV-Infektionen sind. Zur Standarddiagnose ist daher die IC-RT-PCR zu empfehlen. Zur Abklärung von Mischinfektionen empfiehlt sich bei Verdacht die TEM- und Indikatorpflanzen-Analyse.

Die Tatsache, dass immer wieder neue Wirtspflanzen des CLRV aufgespürt werden, legt die Vermutung nahe, dass der natürliche Wirtspflanzenkreis noch wesentlich größer ist als bislang beschrieben. Allein in diesen Untersuchungen konnten die vier Pflanzenarten *Sorbus aucuparia*, *Carpinus betulus*, *Betula nigra* und *Aegopodium podagraria* als neue Wirtspflanzen des CLRV identifiziert werden (3.1). In Russland sollen laut der schriftlichen Mitteilung von Frau Dr. Tscherwjakowa von der Russischen Akademie der Wissenschaft in Moskau CLRV-Isolate, erhalten aus den Gattungen *Lonicera*, *Malus*, *Pyrus*, *Rosa* und *Ribes*, existieren. Auch diese Isolate wurden bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Dies zeigt die enorme Anpassungsfähigkeit des CLRV an neue Wirtspflanzen und Umweltbedingungen auf.

4.2 Genetische Diversität der 3'-nicht-kodierende Region des CLRV-Genoms

Die Fähigkeit zur schnellen Adaption ist ein besonderes Merkmal von Viren, das sich in der großen genetischen Flexibilität und Heterogenität des Virusgenoms äußert (SCHNEIDER &

ROOSSNICK, 2001). Viren besitzen eine enorme evolutionäre Kapazität, die es erlaubt, sich an alle bekannten Gruppen von Organismen zu adaptieren und diese zu parasitieren. RNA-Viren unterliegen ständigen Fehlern bei der Replikation und kurze Generationszyklen können zu Viruspopulationen mit großer Diversität führen. Dies kann zur Folge haben, dass das Virusgenom aus einer Vielzahl leicht unterschiedlicher RNA-Varianten besteht, die oft auch als Quasispezies-Population bezeichnet wird. Aus verschiedenen Studien zu Viruspopulationen ist bekannt, dass der Grad der Heterogenität der Quasispezies je nach Wirtspflanzenart und Virusart unterschiedlich hoch ausgeprägt sein kann (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2001; GUYADER & DUCRAY, 2002). Die Variabilität der Quasispezies wird vom evolutionären Selektionsdruck bestimmt, der auf die Quasispezies bzw. die RNA-Population einwirkt und steht meist im Zusammenhang mit der Wirtspflanzenart, mit Umweltfaktoren und mit der Funktion des Genombereichs. Trifft das Virus beispielsweise auf eine neue ökologische Nische oder unterliegt es durch andere Verschiebungen einem Selektionsdruck, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante in der Population existiert, die bereits besser an die neuen Bedingungen angepasst ist, bei einer variablen Population höher. Starke Variabilität innerhalb einer Population kann jedoch auch Probleme verursachen. Dies ist der Fall, wenn das Virus wiederholten Engpässen (Bottlenecks) unterworfen wird (SCHNEIDER & ROOSSNICK, 2001). Da die meisten Mutationen in der Regel schädlich sind, können häufige Engpässe einen schnellen Verlust der ökologischen Fitness verursachen („Müller’s ratchet“, DUARTE *et al.*, 1992). Daher muss ein Virus, um seine Replikationsfähigkeit zu erhalten, ausreichend genetisch variabel sein, um sich an verändernde Umweltbedingungen schnell anpassen zu können, ohne dabei auf Grund zu hoher Variabilität einer zu großen genetischen Drift ausgesetzt zu sein, die die Fitness, beispielsweise während der Selektion von wenigen genetischen Virus-Varianten bei einem Wechsels von Wirt zu Wirt, stark reduziert (SCHNEIDER & ROOSSNICK, 2001). Hohe Mutationsraten und Rekombination von RNA-Viren werden als evolutionäre Adaption angesehen und sind eine von vielen evolutionären Strategien (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2001). Es ist anzunehmen, dass die Regel eine eingeschränkte Populationsdiversität und somit eine genetische Stabilität darstellt und die Genom-Populationen der meisten Viren aus einer großen Zahl definierter genetischer Varianten und einer geringeren Anzahl zufälliger Varianten bestehen. Die genetische Variabilität und Quasispezies-Struktur von Viren kann sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sein und ist stark von der Evolution der Virusart bestimmt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Variabilität des CLR-V in verschiedenen natürlichen Wirten zu untersuchen und mögliche Zusammenhänge mit der Epidemiologie des Virus zu analysieren.

Es wurde bereits für verschiedene Nepoviren beschrieben, dass die Sequenzen der 3'UTR zwischen der RNA1 und RNA2 identisch bzw. fast identisch sind: *Tomato black ring virus*

(TBRV, GREIF *et al.* 1988), *Tomato ringspot virus* (TRSV, ROTT *et al.*, 1991a, ROTT *et al.*, 1991b), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV, BRAULT *et al.*, 1989; LE GALL *et al.*, 1989; LE GALL *et al.*, 1995), *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV, BACHER *et al.*, 1994). Auch beim Vergleich der RNA1 und RNA2 der 3'UTR des CLRV-Birken-Isolats I₂ konnten keine Unterschiede in der Basenzusammensetzung gefunden werden (SCOTT *et al.*, 1992), so dass angenommen werden muss, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten Primer sowohl an die RNA1 und die RNA2 des CLRV anlagern können.

Um einschätzen zu können, wie heterogen die CLRV-RNA-Populationen der RNA1 und RNA2 in diesem Genombereich sind und ob die Sequenzierung einzelner oder weniger Moleküle eine Basenzusammensetzung widerspiegelt, die repräsentativ und charakteristisch für die Genompopulation einzelner CLRV-Isolate ist, wurde zunächst die Variabilität der mittels IC-RT-PCR amplifizierten Fragmente verschiedener CLRV-Isolate in der 3'UTR des Virusgenoms ermittelt. Der Sequenzvergleich beruht auf einer ca. 380 bp langen Region innerhalb der 3'UTR, die wenige Basen vom PolyA-Schwanz in 5'-Richtung liegt. Es wurden dazu zwei Virusisolate, das Birken-Isolat E120 und das Holunder-Isolat E119, ausgewählt und nach IC-RT-PCR DNA-Einzelkopie-Fragmente in *E. coli* kloniert (3.8). Es zeigte sich, dass die sechs klonierten RNA-Moleküle des Holunder-Isolats und die vier klonierten RNA-Moleküle des Birken-Isolats nicht mehr als ein Nukleotid Sequenzunterschied aufwiesen (3.8). Somit scheint die Variabilität in diesem Teil des Genoms innerhalb einer Virus-Population und somit auch zwischen RNA1 und RNA2 für CLRV relativ gering zu sein. Dieses Ergebnis wurde außerdem durch die Sequenzierung von jeweils 2 Klonen von 31 Isolaten bestätigt, die sich alle als identisch erwiesen. Angesichts der oben beschriebenen evolutionstheoretisch abgeleiteten und experimentell ermittelten hohen genetischen Diversität von Viruspopulationen einer Reihe von pflanzlichen und tierischen Viren, ist dieses Ergebnis erstaunlich und weist darauf hin, dass der untersuchte Bereich des Genoms, obwohl er nicht für Virusproteine kodiert, eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzt. Eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Region könnte beispielsweise eine Beteiligung an der Virusreplikation sein. Die gleichen Annahmen sind von DODD & ROBINSON (1987) für den 3'-terminalen nicht-kodierenden Bereich des Genoms von *Tomato ringspot virus* (TRSV), eines verwandten Nepovirus der Subgruppe 3, aufgestellt worden. Eine Reihe von Autoren haben für verschiedene Nepoviren der Subgruppe 3 gezeigt, dass sich diese durch lange identische oder fast identische 3'UTR-Sequenzen auf RNA1 und RNA2 auszeichnen: z. B. DODD & ROBINSON (1987) und GREIF *et al.* (1988) für *Tomato black ring virus* (TBRV), LE GALL *et al.* (1989) für *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV) ROTT *et al.* (1991b) für *Tomato ringspot virus* (ToRSV), RITZENTALER *et al.* (1991) für *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), SCOTT *et al.* (1992) und BORJA *et al.* (1995) für *Cherry leaf roll virus* (CLRV), BACHER *et al.* (1994) für *Blueberry latent mosaic virus* (BBLMV) und LEHTO *et al.* (2004) für *Blackcurrant*

reversion virus (BRV). BACHER *et al.* (1994) nimmt in seinen Untersuchungen zum BBLMV an, dass die hohe Konservierung der 3'UTR von Nepoviren auf eine bedeutende Funktion dieses Genombereichs hindeutet. Es wird vermutet, dass diese Funktion selektiv aufrechterhalten wird und in den Replikationsprozess eingebunden wird. Ähnliches wird von ROTT *et al.* (1991b) und LE GALL *et al.* (1995) für ToRSV, TBRV und GCMV vermutet. Diese Autoren nehmen an, dass der hohe Grad an Übereinstimmung von RNA1 und RNA2 ein Ergebnis eines Rekombinationsmechanismus beim Replikationsprozess der beiden RNAs ist. Die Veränderung einer der Sequenzen würde demnach eine Reduzierung der Replikation einer der RNAs zur Folge haben, was dazu führen würde, dass die Replikation benachteiligt oder sogar völlig inaktiviert würde. Da nachgewiesen werden konnte, dass sowohl RNA1 als auch RNA2 für die Infektion und Replikation von CLRV notwendig ist (HARRISON *et al.*, 1972; RANGLES *et al.*, 1977), würde bei dem Verlust einer RNA keine Replikation mehr stattfinden. Der Erhalt der optimalen und identischen Sequenz der 3'UTR der RNA1 und RNA2 von Nepoviren und damit auch der Erhalt der Funktion beider RNAs ist demnach notwendig für den Erhalt der Fitness. Die weite Verbreitung und der weite Wirtspflanzenkreis des CLRV setzen jedoch auch voraus, dass CLRV zur Anpassung fähig ist.

Zwischen CLRV-Isolaten aus verschiedenen Wirten deuteten sich beim Größenvergleich der 3'UTR im Agarose-Gel hingegen Unterschiede an, die isolatspezifische Eigenheiten in der 3'UTR des CLRV vermuten lassen (3.7). Zwischen den zwei zunächst untersuchten Isolaten aus Birke und Holunder zeigten sich in diesem Bereich Sequenzunterschiede von 11% und Sequenzlängenunterschiede von vier Basen. Da alle sequenzierten RNA-Moleküle der genomischen Virus-RNA-Populationen eines Virusisolates nahezu keine Variabilität innerhalb dieses Genombereiches aufzeigen, trotz des kurzen untersuchten Teilbereichs jedoch relativ große Unterschiede zwischen den Sequenzen der beiden Isolate bestehen, ist es wahrscheinlich, dass zum einen die Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten isolatspezifisch sind und die Basenzusammensetzung eines RNA-Moleküls für die gesamte RNA-Population sowohl von RNA1 als auch RNA2 in diesem Genombereich repräsentativ ist (3.8), und dass zum anderen eine genetische Veränderung in Anpassung an die Wirtspflanze stattgefunden hat. Die Unterschiede in der Sequenz zwischen dem Birken- und Holunder-Isolat sind der Beweis dafür, dass sich CLRV in der 3'UTR genetisch verändern kann und lassen vermuten, dass eine Interaktion dieser Bereiche nicht ausschließlich mit virus-kodierten Proteinen, wie z. B. der an der Replikation beteiligten eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, sondern auch mit wirtseigenen und wirtsspezifischen Faktoren erfolgt, die eine evolutionäre Adaption des Virus in der 3'UTR an den Wirt erforderlich machen und im direkten Zusammenhang mit dem großen natürlichen Wirtspflanzenkreis des CLRV stehen.

Aufgrund des sich aus diesen Analysen ergebenden möglichen Bedeutung der Wirtspflanze für die Variabilität der 3'UTR war es zunächst wichtig zu untersuchen, inwiefern die Vermehrung von CLRV-Isolaten in Indikatorpflanzen einen Einfluss auf die untersuchte Sequenz der 3'UTR hat. Es galt zu klären, ob Virusisolate, die wiederholt in Indikatorpflanzen vermehrt wurden, überhaupt Rückschlüsse auf die genetischen Eigenschaften von Viruspopulationen in den Original-Wirtspflanzenarten zulassen, oder ob durch den Einfluss der Indikatorpflanzen und die Anpassung des Virus sich das Virusgenom stark verändert hat. Zur Abschätzung des Einflusses der zur Vermehrung verwendeten Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa* auf die Stabilität des CLRV-Genoms wurde die 3'UTR aus vermehrten Isolaten und aus Original-Proben dergleichen Standorte und aus verschiedenen Jahren mittels IC-RT-PCR amplifiziert und die Sequenzen miteinander verglichen (3.8). Die Ergebnisse zeigten, dass in der zur Vermehrung von CLRV-Isolaten verwendeten Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa* auch bei jahrelanger Vermehrung über mehr als 20 Jahre im Gewächshaus, Veränderungen des Genoms im 3'UTR-Bereich eher selten sind und somit der Einfluss der zur Vermehrung eingesetzten Indikatorpflanzen auf die Diversität des Genomabschnitts im 3'UTR-Bereich von CLRV in der phylogenetischen Analyse vernachlässigt werden kann.

Zum Einfluss der Indikatorpflanzen auf die Veränderung von Virus-Populationen sind relativ wenige Arbeiten publiziert. In Untersuchungen zur Diversität von Pflanzenviren wird dieser Aspekt ähnlich wie die durch die *Taq*-Polymerase in der PCR und Sequenzierung erzeugten Fehler oft völlig vernachlässigt. Aus den wenigen verfügbaren Analysen geht hervor, dass das Ausmaß der Veränderung einer Virus-Population bei Vermehrung in Indikatorpflanzen spezifisch von der Indikatorpflanzenart-Virusart-Kombination abhängt. SCHNEIDER & ROOSSNICK (2001) beschreiben, dass für *Tobacco mosaic virus* (TMV) und *Cucumber mosaic virus* (CMV) bei Vermehrung in verschiedenen Wirtspflanzen beim Vergleich der vollständigen RNA-Virussequenzen große Unterschiede in der Viruspopulation beobachtet werden können. Auch die vorhandenen Untersuchungen zur Indikatorpflanzenart *Chenopodium quinoa* bei Infektion mit verschiedenen Virusarten zeigen, dass die Wirt-Virus-Kombination eine wichtige Rolle in der Selektion von Viruspopulationen spielt (LIANG *et al.*, 2002, NARAGHI-ARANI *et al.*, 2001). Da im vorliegenden Wirt-Virus-System (*C. quinoa*-CLRV) nachgewiesen wurde, dass der Einfluss der Indikatorpflanze auf die Nukleotidsequenz des 3'UTR-Abschnitts von CLRV-Varianten nach Vermehrung gering ist, ermöglicht dies die im folgende dargestellte gemeinsame phylogenetische Analyse von Sequenzabschnitten, die sowohl aus Original-Proben als auch aus im Gewächshaus vermehrten CLRV-Isolaten amplifiziert worden sind. Hierdurch waren aussagekräftige Vergleiche mit einer Vielzahl von CLRV-Isolaten möglich, die für diese Studie von Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurden und in der Literatur z. T. ausführlich beschrieben wurden.

Durch phylogenetische Untersuchungen wurde die Bedeutung der natürlichen Original-Wirtspflanzenarten für die Diversität von CLRV-Isolaten ermittelt. Der Stammbaum der phylogenetischen Analyse von 280 bp langen Sequenzen der 3'UTR von 73 CLRV-Isolaten aus 20 verschiedenen Gehölzarten zeigte eine Gruppierung in sieben phylogenetische Gruppen, die zum großen Teil durch die natürliche Original-Wirtspflanzenart definiert sind. (3.10) So ergeben sich eine Holunder-, eine Walnuss-, eine Süßkirschen-, eine Rhabarber-, eine Himbeer-, eine Ulmen- und eine Hartriegel-Gruppe. Innerhalb der Walnuss-Gruppe bestand eine zusätzliche geographische Differenzierung zwischen Isolaten aus West- und Ost-Europa. Der Sequenzvergleich (3.9) des 380 bp langen Teilbereichs der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region des viralen Genoms von 67 verschiedenen Isolaten zeigte einen signifikanten Grad an genetischer Variabilität (0 % bis 15,5 %) und deutliche Unterschiede zwischen der Inter-Gruppen- und der Intra-Gruppen-Sequenzdiversität. Ähnliche Sequenzvariabilitäten (0 % bis 16,4 %) konnten auch beim Vergleich der 280 bp langen Sequenzen von 73 CLRV-Isolaten festgestellt werden.

Sequenzdiversitäten innerhalb der 3'UTR von Virusstämmen oder Virus-Isolaten wurden bereits für andere Pflanzenviren beschrieben. MUKASA *et al.* (1993) beschreibt beispielsweise für eine ca. 300 bp lange Sequenz von acht Isolaten des *Sweet potato mild mottle ipomovirus* (SPMMV) eine Sequenzdiversität innerhalb der 3'UTR von 0 % bis 15,3 %. Dies ähnelt auch der Variabilität des CLRV. Auch für Nepoviren wurden bereits Sequenzunterschiede in diesem Genombereich ermittelt. So zeigt der Vergleich der 3'UTR von 10 Isolaten des *Blackcurrant reversion nepovirus* (BRV, gehört wie CLRV zur Untergruppe 3), eine Sequenzdiversität von 1,2 % bis 5,9 %. Zu beachten ist hierbei, dass die Wirtspflanze (Brombeere) für alle BRV-Isolate identisch ist. Vergleicht man dies mit den Diversitäten von CLRV-Isolaten derselben Wirtspflanze, wie beispielsweise aller Walnuss-Isolate, so ähneln sich auch diese Werte (0,4 % bis 7,7 %). Die paarweisen Übereinstimmungen aller 380 bp langen CLRV-Sequenzen im Vergleich zueinander ergeben Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten von 5 % bis 16 % und Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten von 0 % bis 10 %. Vergleicht man diese Werte mit denen von IWANAMI *et al.* (2001) für das *Satsuma dwarf related nepovirus* (SDV-RV) beschriebenen Inter- bzw. Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten für die gesamte 3'-terminale nicht-kodierende Region (8 % bis 33 % bzw. 4 % bis 8 %), so erkennt man, dass sich die Identitäts-Werte des CLRV innerhalb und zwischen den Gruppen stärker überschneiden. Für das *Tomato black ring nepovirus* (TBRV) ist in Untersuchungen des gesamten Genoms mittels Restriktionsanalysen festgestellt worden, dass die 3'UTR des Genoms eine geringere Variabilität aufweist als die 5'-UTR, das die kodierenden Bereiche unter anderem für das Hüllprotein aufweist (JOŃCZYK *et al.*, 2004). Auch dieses ist wiederum ein Hinweis auf die wichtige funktionelle Relevanz

der nicht-kodierenden 3'UTR, das möglicherweise durch strenge evolutionäre Selektion konserviert wird.

4.3 Genetische Diversität der Hüllprotein Region des CLRV-Genoms

Zusätzlich zum 3'-terminalen Bereich des CLRV wurde für eine begrenzte Anzahl von Proben die genetische Diversität für den Hüllprotein-Bereich untersucht (3.11). Insgesamt konnte die Nukleotidsequenz von zwei Walnuss- und zwei Holunder-Isolaten identifiziert und mit bereits veröffentlichten Sequenzen verglichen werden. Im Vergleich der Nukleotid- bzw. Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins wurden insgesamt neun Isolate aus den natürlichen Wirtspflanzenarten Birke, Walnuss und Holunder einbezogen. Die Ergebnisse zeigten eindeutige Unterschiede zwischen Isolaten aus den unterschiedlichen Wirtspflanzenarten bzw. geringe Diversitäten von Isolaten gleicher Wirtspflanzenarten (0 % bis 6 %), so dass sich die CLRV-Isolate wiederum in Abhängigkeit von der natürlichen Wirtspflanzenart in drei Gruppen differenzieren lassen (Holunder-, Walnuss- und Birkengruppe) (3.11). Auch dieses Ergebnis gleicht den Ergebnissen zur Gruppierung von CLRV-Isolaten in Abhängigkeit von der natürlichen Wirtspflanze aus den molekularen Untersuchungen der 3'UTR und unterstützt zusätzlich die Ergebnisse zur Gruppenzuordnung. Die Intra- und Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten der Nukleinsäuresequenzen von 0 % bis 6 % bzw. 16 % bis 22 % sind etwas höher als die Sequenzdiversitäten im 3'UTR-Bereich. Vergleicht man die Intra- und Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten der Hüllprotein-Aminosäuresequenz des CLRV von 0 % bis 3 % bzw. 8 % bis 16 % mit denen von IWANAMI *et al.* (2001) für das *Satsuma dwarf related nepovirus* (SDV-RV) beschriebenen Inter-Gruppen-Sequenzdiversitäten bzw. Intra-Gruppen-Sequenzdiversitäten der Hüllprotein-Aminosäuresequenz (1 % bis 2 % bzw. 8 % bis 18 %), so ist erkennbar, dass sich auch diese Werte ähneln und sich die prozentualen Sequenzunterschiede der Nukleinsäuresequenzen erwartungsgemäß in geringeren Aminosäure-Sequenzdiversitäten für das CLRV-Hüllproteins widerspiegeln.

4.4 Korrelation zwischen der Sequenzdiversität der 3'UTR und epidemiologischen Faktoren

Phylogenetische Gruppierungen, errechnet anhand genetischer Distanzen, die auf Vergleichen genomischer Nukleotidsequenzen basieren, wurden bereits für eine große Zahl von verschiedenen Isolaten verschiedenster Pflanzenviren berechnet. Dabei konnten in vielen Fällen Gruppenaffinitäten der Isolate bzw. Stämme sowohl zur geographischen Herkunft als auch in kleinerem Ausmaß zur natürlichen Wirtspflanzenart festgestellt werden (BOUSALEM *et al.*, 2000; GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2001; KRAUSE-SAKATE *et al.*, 2002; OHSHIMA *et al.*, 2002; ROOSSNICK *et al.*, 1999; TOMONURA *et al.*, 2004). Daher wurden in dieser Arbeit

die Sequenzdiversitäten des untersuchten Teilbereichs der 3'UTR aller CLRV-infizierten Proben mittels statistischer Analysen (G_{ST} -Koeffizient, 3.14, Mantel-Test, 3.15) auf eine Korrelation mit zwei wichtigen epidemiologischen Einflussfaktoren, der Original-Wirtspflanzenart und der geographischen Distanz, hin untersucht. Die Intra- und Inter-Populationsdiversität, die mit Hilfe des G_{ST} -Koeffizienten berechnet wurden, zeigten dass bei einer forcierten Gruppierung der Isolate nach der natürlichen Wirtspflanzenart mit einem G_{ST} -Wert von 39% eine engere Beziehung zwischen den Isolaten und diesem zur Gruppierung verwendeten Faktor erhalten wird, als bei einer forcierten Gruppierung der Isolate nach dem Herkunftsland (G_{ST} -Wert: 26%). Der G_{ST} -Wert der Kontrolle (Gruppierung der Isolate nach der phylogenetischen Einordnung anhand der 3'UTR-Sequenzen (3.10)) liegt mit 70 % fast doppelt so hoch. Diese Analyse zeigte eine Tendenz an, gab jedoch keinen statistisch gesicherten Aufschluss über die Signifikanz der Aussage. Daher wurde in diesen Untersuchungen zusätzlich der Mantel-Test herangezogen (3.15), wodurch es ermöglicht wird, statistische Signifikanzen von vergleichbaren Matrizen zu berechnen. In diesen Test wurden alle 41 Sequenzen, die aus Deutschland stammten, einbezogen, und die Signifikanz der Korrelation zwischen der genetischen und geographischen Distanz sowie die Korrelation zwischen der genetischen Distanz und der natürlichen Wirtspflanzenart errechnet. Zusätzlich wurde die Signifikanz der Korrelation zwischen der genetischen Distanz und der geographischen Distanz für alle 18 Holunder-Isolate und allen 9 Birken-Isolate aus Deutschland berechnet. In diesen Untersuchungen konnte beim Vergleich aller 41 Isolate aus Deutschland keine Signifikanz für die Gruppierung des CLRV unter Berücksichtigung aller 3'UTR-Sequenzen in Bezug auf das Herkunftsgebiet gefunden werden. Auch der Vergleich der neun Birken-Isolate zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Beim Vergleich der Sequenzen aller 18 deutschen Holunder-Isolate konnte hingegen eine schwache, aber signifikante Korrelation festgestellt werden. Da eine signifikante Korrelation zwischen der genetischen und geographischen Distanz der Holunder-Isolate in Deutschland, aber keine signifikante Korrelation zwischen der genetischen und geographischen Distanz aller deutschen CLRV-Isolate aus verschiedenen Wirtspflanzen und auch nicht zwischen allen Birken-Isolaten aus Deutschland bestand, wird verdeutlicht, dass geographische Faktoren nur einen geringen Einfluss auf die Diversität des CLRV-Genoms besitzen und andere bedeutendere epidemiologische Faktoren überwiegen müssen. Der mögliche geographische Einfluss in Bezug auf die genetische Diversität scheint somit nicht ausschlaggebend für die phylogenetische Gruppierung zu sein, besonders wenn Artgrenzen bei der Analyse ignoriert werden, wie die Analyse aller 41 deutschen Isolate aus verschiedenen Arten zeigte. Vergleicht man die Beziehungen der genetischen Diversität der 41 CLRV-Isolate in diesem Genombereich mit den natürlichen Wirtspflanzenarten dieser Isolate ($r = 0,42$) mittels Mantel-Test (3.15), so erhält man eine wesentliche höhere signifikante Korrelation, als im Vergleich zur geographischen Distanz ($r = 0,035$). Für alle CLRV-Isolate derselben

Wirtspflanzenart zeigt sich somit eine starke Tendenz zur phylogenetischen Gruppierung. Anhand dieser statistischen Untersuchungsergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die genetische Variabilität der 3'UTR des CLRV von beiden Faktoren, der Wirtspflanzenart und der geographischen Herkunft, abhängig zu sein scheint, die Wirtspflanzenart jedoch einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die genetische Zusammensetzung von CLRV-Populationen ausübt. Artspezifische Barrieren spielen also möglicherweise eine Rolle bei der genetischen Gestaltung der CLRV-Diversität im 3'UTR-Bereich. Die Ursachen für die hier beschriebenen genetischen Differenzierungen der CLRV-Isolate nach der natürlichen Wirtspflanzenart und zu einem wesentlich geringeren Ausmaß nach der geographischen Herkunft, konnten bislang noch nicht geklärt werden. Die statistischen Analysen zeigten, dass der Einfluss dieser Faktoren dabei zwar unterschiedlich, aber nicht unbedingt voneinander unabhängig war. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Virusadaption an die Wirtspflanze eine bedeutende Rolle spielt, wurde durch die phylogenetischen Stammbäume der 3'UTR-Sequenzen verdeutlicht. Jedoch gruppierten sich auch einige Isolate in phylogenetische Gruppen, die nicht zur Mehrheit der Isolate derselben Wirtspflanzenart gehören. Dieses Ergebnis zeigt daher, dass die CLRV-Isolate, die zu diesen Gruppen gehören, die Fähigkeit besitzen, ein breites Spektrum an potenziellen Wirtspflanzenarten zu infizieren. So scheinen die natürliche Wirtspflanzenart und die geographische Distanz nicht die alleinigen ausschlaggebenden Faktoren für diese genetische Differenzierung zu sein. Weitere epidemiologische Faktoren sind möglicherweise von großer Bedeutung.

4.5 Sekundärstrukturanalyse der 3'-nicht-translatieren Region des CLRV-Genoms

RNA besitzt eine Vielzahl biologischer Funktionen. Sie ist Träger genetischer Information und kann an der Katalyse chemischer Reaktionen beteiligt sein. Durch komplexe dreidimensionale Faltungen, können beispielsweise chemische Gruppen, die essentiell für die Funktion der RNA als biologischer Katalysator sind, präzise angelagert werden oder als Gerüst genetischer Informationen für Strukturzwecke dienen (BATEY *et al.*, 1999). Viele RNA-Viren mit positiv-Strang-Orientierung besitzen genomische RNA-Moleküle mit ausgeprägter Fähigkeit zur Faltung und Sekundärstruktur-Bildung. Das 3'-Ende von vielen positiv-Strang RNA-Viren beinhaltet definierte Sequenzen und Strukturelemente, wie tRNA-ähnliche Strukturen, Pseudoknoten und poly(A)-Schwänze, die als cis-acting Faktoren für die Replikation und/oder Replikasebindung erforderlich sind (SONG & SIMON, 1995; GOODWIN & DREHER, 1998). Die 3'UTR der Alfamo- und Ilarvirus-RNA faltet sich beispielsweise in eine Reihe von Stemloop-Strukturen, an welche das Hüllprotein mit einer hohen Affinität bindet. Diese Bindung initiiert die Infektionen (Genomaktivierung) und ist für die Replikation des *Alfalfa mosaic virus* erforderlich. Der Aufbau ähnelt tRNA-Strukturen von verwandten Bromo- und Cucumoviren. Pseudoknoten sind ein zentraler Teil der tRNA-Strukturen und spielen auch bei der Aminoacylation und bei der Replikation von Bromo- und Tymoviren eine Rolle.

Dabei besitzt die 3'UTR eine Bindungsstelle für das Hüllprotein, die durch das Stemloop flankierende AUGC-Motiv charakterisiert wird (OLSTHOORN *et al.*, 1999). Auch konnten Stemloops in der 3'UTR des *Turnip crinkle virus* (TCV) gefunden werden. 29 Basen des positiven Strangs stellen dabei den Promotor für die (-)-Strang-Synthese dar. Es konnte gezeigt werden, dass kompensatorische Austausche von vier Basen in dem unteren Teil des Stamms oder Veränderungen in der Sequenz und Größe des Loops die *in vitro* Transkription nicht beeinflusst. Diese Bereiche scheinen daher nicht wichtig für die Interaktion mit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) zu sein. Einzelne Mutationen im Stamm oder Doppel-Mutationen im oberen Teil reduzierte hingegen die Aktivität *in vitro* enorm. Auch dies zeigt, dass die Anzahl und Form der Stemloops eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzt. Auch für Viren aus der Gattung der Cucumoviren, wie z. B. das *Cowpea mosaic virus* (CPMV), die mit Nepoviren in der Familie *Comoviridae* vereinigt sind, sind RNA-Sekundärstrukturen mit Stemloop-Struktur im 3'-terminalen Bereich der genomischen RNA beschrieben, die möglicherweise an der Replikation beteiligt sind (DUGGAL *et al.*, 1994).

Die Untersuchungen zur Sekundärstruktur der Konsensus-Sequenz von 67 CLRV-Isolaten innerhalb der 3'UTR konnten zwei konservierte Stemloops innerhalb der 380 bp Sequenz identifizieren, die bei allen Isolaten identisch sind. Die Funktion dieser Stemloops ist noch ungeklärt. Auch HOFACKER (2004) konnte in seinen Untersuchungen zur Sekundärstruktur verschiedener Pflanzenvirusfamilien in Bezug auf die Familie der *Comoviridae* konservierte Elemente mit einer großen Zahl an kompensatorischen Mutationen für die Genera Comovirus, Fabavirus und Nepovirus feststellen. Dabei traten Stemloops mit einem hochkonservierten Stem und einer A/U-reichen Loop-Region auf. Alle RNA-Viren, die untersucht wurden, besitzen dabei funktionelle RNA-Strukturen, die vor allem in der 5'UTR und der 3'UTR auftreten, aber auch in den kodierenden Regionen nicht selten vorkommen. Diese Strukturen erinnern an das cis-acting replication element (CRE) der Familie *Picornaviridae*, die auf der RNA entweder als Verstärker (enhancer) für den Transkriptionsstart oder als Abschwächer (silencer) wirken. Auf Grund der starken Konserviertheit der Stemloop-Strukturen der 3'UTR des CLRV ist zu vermuten, dass sekundäre bzw. tertiäre Strukturen in den Replikationsprozess involviert sind. Jede Veränderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur dieser RNA-Moleküle könnte die Replikationsrate reduzieren und würde ausselektiert werden. Der hohe Selektionsdruck zum Erhalt der Fitness zu Rückmutationen und kompensatorischen Mutationen, die eine optimale Sekundär- oder Tertiärstruktur wiederherstellen, würde demzufolge helfen, die optimale Struktur zu erhalten. SCOTT *et al.* (1992) haben bei der Analyse einer Einzelsequenz der RNA1, die die gesamte 3'UTR von ca. 1,5 kb für das Birken-Isolat I₂ des CLRV umfasst, bereits auf mögliche Sekundärstrukturen hingewiesen, die im Vergleich mit der 380 bp langen Konsensussequenz dieser Arbeit u. a. zwischen den Basenpositionen 130 und 234

liegen. Durch die Sekundärstrukturanalysen der Konsensus-Sequenz in der vorliegenden Arbeit konnte das Auftreten von Stemloops und deren potenzielle Bedeutung in diesem Bereich (126 bis 145 Basen bzw. 175 bis 196 Basen vom 5'-Ende abwärts) des CLRV-Genoms bestätigt und abgesichert werden. Die experimentelle Testung dieser Hypothese zur funktionellen Bedeutung der 3'UTR-Genomregion erfordert eine gezielte Komplementations- und Mutationsanalyse, ausgehend von infektiösen Volllängenklonen eines CLRV-Isolates, für das mit der Erschließung längerer Genomabschnitte des Holunder-Isolats E603 (3.13) in dieser Arbeit erste Schritte erfolgt sind.

4.6 Korrelation von genetischer und serologischer Diversität

Es existieren eine Reihe von serologischen Studien zur Variabilität von CLRV, die u. a. zeigten, dass CLRV-Isolate verschiedener Wirtspflanzen aus den USA serologisch enger verwandt sind, als Isolate von derselben Wirtspflanze aus den USA und Europa. Auch für weitere CLRV-Isolate konnten serologische Unterschiede zwischen Isolaten aus verschiedenen Ländern festgestellt werden (ROWHANI & MIRCETICH, 1988; COOPER & EDWARDS, 1980). Vielfach werden Wirtspflanzenarten in diesen Veröffentlichungen jedoch nur durch ein Isolat vertreten, so dass es schwierig ist, generelle Aussage zu treffen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine größere Zahl von bereits in der Literatur beschriebenen und neu gewonnenen CLRV-Isolaten für serologische und vergleichende phylogenetische Studien eingesetzt, um geographische Einflüsse und andere mögliche epidemiologische Einflüsse zu evaluieren.

Der Vergleich von 24 CLRV-Isolaten unter Verwendung von sieben monoklonalen Antikörpern (mAb), die gegen das Walnuss-Isolat CTIFL aus Frankreich produziert worden sind, zeigte eine ähnlich hohe Diversität zwischen den CLRV-Isolaten (3.17) wie die phylogenetische Analyse der 3'UTR- (3.10) und der Hüllprotein-Region (3.11). Der Vergleich beschränkt sich hierbei auf alle Isolate, bei denen eine Vermehrung auf krautigen Testpflanzen erfolgreich war (3.3). Die Ergebnisse zeigten, dass zwischen den CLRV-Isolaten auch serologisch eine Variabilität bestand, die eine Einteilung in ähnliche Gruppen ermöglichte, wie es der Sequenzvergleich der 3'UTR und der Hüllprotein-Region bereits zeigte. So zeigten sich sowohl in Bezug auf den polyklonalen Antikörper als auch auf die sieben monoklonalen Antikörper (mAb) unterschiedliche Reaktionsstärken der CLRV-Isolate. Damit ließen sich die Isolate mittels mAb-Analyse in vier Haupt-Serogruppen einteilen. Die Mehrheit der Mitglieder einer Serogruppe besitzt, wie auch in der phylogenetischen Analyse, die gleiche natürliche Original-Wirtspflanzenart, woraus der Name der Serogruppe resultiert und die Gruppen in die Süßkirschen-Gruppe, die Himbeer-Gruppe, die Walnuss-Gruppe und die Holunder-Gruppe eingeteilt werden (3.17). Die dargestellten Ergebnisse, die eine signifikante serologische Variabilität zwischen CLRV-Isolaten demonstrieren, stimmen auch

mit den in der Literatur beschriebenen serologischen Untersuchungen überein, welche mit bis zu zehn CLRV-Isolaten unter Verwendung von verschiedenen polyklonalen Antikörpern durchgeführt worden sind. Die mittels Agarose-Doppeldiffusionstest durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern von JONES (1976) zeigten beispielsweise, dass sich die acht CLRV-Isolate aus den Wirtspflanzen *Betula pendula*, *Rubus procerus*, *Prunus avium*, *Cornus florida*, *Ulmus americana*, *Rheum rhabarbarum*, *Sambucus ebulus* und *Sambucus canadensis* serologisch voneinander unterscheiden lassen. Beim Vergleich von CLRV-Isolaten einer Wirtspflanze und verschiedenen Herkunftsgebieten, war eine Unterscheidung hingegen nicht möglich. Diese Untersuchungen wurden mit zwei Süßkirschen-Isolaten sowie mit neun Isolaten aus *S. canadensis* aus den USA, einem Isolat aus *S. nigra aurea* aus Kanada und vier Isolaten aus *S. nigra* aus Angus und Perthshire in Schottland durchgeführt. Dass Isolate derselben Wirtspflanzen identische serologische Reaktionen zeigen, sich die Reaktionen aber abhängig von den Original-Wirtspflanzenarten unterscheiden, belegten auch die Untersuchungen von JONES & MURANT (1971), SCHIMANSKI *et al.* (1975a), SCHMELZER *et al.* (1972a), SCHMELZER (1972b), TÓBIÁS (1995) und WALKEY & STACE-SMITH (1972). Somit korrelieren diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der mAb-Analyse dieser Arbeit. Der Einsatz von mAbs ermöglichte jedoch eine klarere Differenzierung der Isolate (3.17). Die Gruppierung der abgeleiteten Hüllprotein-Sequenzen für 4 Walnuss- und Holunder-Isolate (3.11) betätigen ebenfalls die serologischen Analysen.

Der Vergleich der molekularen und serologischen Ergebnisse zeigt, dass sich die Gruppenzugehörigkeiten der CLRV-Isolate (abgesehen von wenigen Ausnahmen) sehr ähneln. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die vom Aufbau des Hüllproteins des CLRV abhängige serologische Reaktivität sowie die Basenzusammensetzung der 3'UTR charakteristische Eigenschaften für bestimmte CLRV-Isolate darstellen, und dass Rekombination zwischen dem Hüllprotein und dem Ende des 3'UTR der einzelnen Isolate für CLRV möglicherweise selten ist. Diese Vermutung wird durch die durchgeführte Rekombinationsanalyse bestätigt (3.12), die mit Hilfe von sechs verschiedenen Programmen für die 3'UTR und die Hüllproteinregion durchgeführt worden ist. Dabei gab die Rekombinationsanalyse keinerlei Hinweise auf eine Rekombination in diesen Genombereichen. Aufgrund dieser Analysen lässt sich vermuten, dass Rekombinationen tatsächlich weder im CP- noch im 3-terminalen Bereich des CLRV-Genoms häufig zu sein scheinen. Einschränkend muss gesagt werden, dass das Auftreten von Rekombinationen in Bezug auf das gesamte CLRV-Genom durch diese Ergebnisse nicht widerlegt werden kann, da die untersuchten Bereiche nur einen relativ kleinen Teil des gesamten Genoms repräsentieren (ca. 13 %). Die erfolgreichen Arbeiten zur Erschließung der Sequenz des Genombereichs zwischen der Hüllprotein-Region und der 3'UTR für ein Holunder-Isolat

mittels Primer Walking in dieser Arbeit (3.13) haben die Grundlage für zukünftige umfangreichere phylogenetische Analysen und Rekombinationsanalysen unter Einbeziehung größerer Genomabschnitte gelegt.

4.7 Bedeutung der Epidemiologie als Ursache der CLRV-Diversität

Nach dem bisherigen Forschungsstand erfolgt die natürliche Übertragung des CLRV auf gesunde Pflanzen nur durch Bestäubung infizierter Pollen und durch Samenübertragung. Obgleich eine Nematodenübertragung für CLRV wegen seines taxonomischen Status in dem Genus *Nepovirus* vermutet worden ist, wurde dieses experimentell widerlegt (WANG *et al.*, 2002) und von Übertragungen durch andere biologische Vektoren, z.B. Insekten, ist bislang nicht berichtet worden. Samen- und Pollenübertragung ist ein Mechanismus, der keine Übertragungen über Artgrenzen hinweg erlaubt. Virusübertragungen ausschließlich durch Pollen würden für einen hohen Grad an Artspezifität in der Virusausbreitung sorgen, insbesondere, wenn tatsächlich Pollenkeimung und -befruchtung für die Infektion der Rezeptorpflanze nötig sind. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass CLRV-Partikel auf der Oberfläche und im Inneren von Pollenkörnern gefunden werden konnten, die von infizierten Birken- und Walnusspflanzen produziert wurden und zeigen, dass die Pollenkeimung tatsächlich für eine Virusübertragung notwendig ist (MASSALSKI & COOPER, 1984). Dies würde bedeuten, dass eine natürliche Übertragung nur innerhalb einer Wirtspflanzenart möglich ist. Die Existenz dieser natürlichen Barriere könnte die Ursache der in dieser Arbeit dokumentierten wirtspflanzenspezifischen Anpassung des CLRV sein, da eine häufige und schnelle Übertragung des Virus zwischen unterschiedlichen Wirtspflanzen nicht möglich ist, wie sie für viele andere Pflanzenviren dokumentiert wird. Aufgrund effizienter genetischer Isolation von CLRV-Genotypen bei ausschließlichem Vorliegen eines pflanzenartspezifischen Übertragungs- und Ausbreitungsmechanismus, wie der Pollen- und Samenübertragung, ist eine effiziente Selektion und Anpassung an eine Wirtspflanzenart zur Aufrechterhaltung der Fitness zwingend erforderlich. Diese artspezifischen Übertragungssperren würden auch die genetische Isolierung der Virusisolate innerhalb der jeweiligen Wirtspopulation und damit eine Entwicklungsabweichung der Viruspopulationen und die Möglichkeit der Wirtsadaptation über lange Sicht erklären.

Ein Vergleich der Populationsdiversität verschiedener nah verwandter Nepoviren mit unterschiedlicher Biologie der Wirtspflanzen gibt weitere Hinweise für die mögliche Relevanz der beschriebenen epidemiologischen Parameter für die beobachtete Populationsstruktur des CLRV. Das nah verwandte *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), wie CLRV ein Nepovirus der Untergruppe 3, besitzt z. B. im Gegensatz zum CLRV eine ausgeprägte Quasispezies-Struktur mit hoher genetischer Diversität (NARAGHI-ARANI *et al.*, 2001). Diese Variabilität des Genoms scheint vor allem auf die starke Durchseuchung der Anbauflächen mit den

Nematoden als natürliche Vektoren, der üblichen vegetativen Vermehrung und Pfropfung bei Wein und der weltweiten Verbreitung von Pflanzenmaterial zurückzuführen zu sein. Aufgrund dieser epidemiologischen Einflussfaktoren ist auch nicht erstaunlich, dass Mischinfektionen mit GFLV mit einer Reihe von Virus-Stämmen in Weinanlagen häufig zu finden sind. Die Vermutung liegt hier nahe, dass die ausgeprägte Quasispezies-Populationsstruktur in direktem Zusammenhang mit der intensiven landwirtschaftlichen Kultivierung der natürlichen Wirtspflanze dieses Virus, der Weinrebe begründet liegt (VIGNE *et al.* 2004). Für CLRV sind eine Reihe dieser epidemiologischen Einflussfaktoren nicht bedeutsam, da die Übertragung und Ausbreitung durch Nematoden und landwirtschaftliche Praktiken nicht vorhanden bzw. stark eingeschränkt zu sein scheint und dieses eine mögliche Erklärung für die homogene Populationsstruktur von CLRV-Isolaten aus verschiedenen Gehölzarten ist. Ein weiterer Einflussfaktor ist die im Vordergrund stehende natürliche Übertragung durch Pollen und Samen, die bei GFLV und anderen Nepoviren nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Diese Rolle der Pollenübertragung in Bezug auf die Struktur der CLRV-Population wurde bereits durch COOPER & ATKINSON (1975) auf der Grundlage von serologischen Unterschieden postuliert, die zwischen CLRV-Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen beobachtet wurden. Die Fähigkeit einiger Virusisolate, sich außerhalb der "artspezifischen" phylogenetischen Gruppen einordnen, zu der sie gehören sollten (das Holunder-Isolat E441 gruppiert sich beispielsweise in die Süßkirschen-Gruppe), zeigt allerdings, dass diese Übertragungssperren nicht absolut sind und dass vermutlich Mechanismen für Übertragungen über Artgrenzen hinweg existieren, wenn dies auch nur in selteneren Fällen als die Pollen- und Samenübertragung erfolgt. Da einige der phylogenetischen Gruppen aus einer Vielzahl an Isolaten unterschiedlicher Wirtspflanzenarten besteht, könnte man auch annehmen, dass die Übertragungssperren möglicherweise bei verschiedenen Wirtspflanzenarten unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Dies würde bedeuten, dass nur in besonderen Fällen eine natürliche Übertragung zwischen unterschiedlichen Paaren oder Gruppen von Wirten generell möglich ist. Die Übertragung von CLRV-Stämmen über Artgrenzen verschiedener Baumarten hinweg durch das Eindringen von Pollen in Wunden oder durch das Anstechen von Insekten wurde daher als möglicher natürlicher Übertragungsmechanismus diskutiert. JONES (1973) zeigte in Übertragungsversuchen von CLRV-Isolaten aus Rhabarber, Kirsche, Holunder und Ulme, dass sich diese nicht nur auf die Pflanze rückübertragen lassen, aus der CLRV isoliert worden ist, sondern auch auf andere Gehölze. So lässt sich CLRV aus Rhabarber beispielsweise auf Rhabarber-Pflanzen rückübertragen und ist gleichzeitig in der Lage Holunder und Kirsche zu infizieren, wobei der Übertragungserfolg auf Holunder und Kirsche sehr gering war (1 von 10 Pflanzen und 1 von 3 Pflanzen). Eine Übertragung dieses Isolats auf Ulme brachte hingegen keinen Erfolg. ROWHANI & MIRCETICH (1988) zeigte auch, dass eine Übertragbarkeit des CLRV-Walnuss-

Isolats W8 auf Süßkirsche generell möglich ist. Somit wäre es denkbar, dass eine Übertragung allgemein von Rhabarber-, Holunder-, Birken und Kirschen und Walnuss-Isolaten auf andere Gehölze generell möglich ist und die genetische Isolation und Anpassung an die Wirtspflanzenart noch nicht so weit fortgeschritten ist, dass Artgrenzen nicht mehr überschritten werden können. Eine weitere Möglichkeit der gattungsübergreifenden Übertragung ist die Infektion der Pflanzen durch CLRV-kontaminierte Pollen, die von Insekten verschleppt werden und in Wunden gelangen. Die epidemiologische Bedeutung ist jedoch nicht klar. Dass die Blühperioden der verschiedenen Wirtspflanzenarten des CLRV die Ursache für die unterschiedlichen Übertragungseffizienzen zwischen unterschiedlichen Arten ist, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch relativ unwahrscheinlich. So blühen beispielsweise Sand-Birken und Walnussbäume in Deutschland zusammen in den Monaten April bis Mai, bilden aber jeweils eine phylogenetische Gruppe.

Anders als die meisten Nepoviren, die bisher unter populationsgenetischen Gesichtspunkten untersucht wurden, scheint CLRV keine biologischen Vektoren zu besitzen. Allerdings konnte CLRV mittels RT-PCR in oder an Birkenwanzen (*Kleidocerys resedae*) nachgewiesen werden (WERNER *et al.*, 1997). Ob diese Wanzenart jedoch an der natürlichen Übertragung des CLRV beteiligt ist, ist bislang ungeklärt. Auch in dieser Arbeit konnte CLRV an oder in der Birkenwanze und in einer Rüsselkäferart nachgewiesen werden (3.1.1). Dass sich die an der Birkenwanze nachgewiesene CLRV-Sequenz von der der aus dem Blattmaterial des untersuchten Birkenbaumes amplifizierten CLRV-Sequenz in der Basenzusammensetzung unterschied, deutet allerdings auf eine Beteiligung der Birkenwanze bei der Verschleppung von CLRV hin. Obgleich weitere experimentelle Arbeit erforderlich ist, die dargelegten Hypothesen zu bestätigen, stellen die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal einen starken Hinweis für eine wirtsbasierende Selektion der Viruspopulation für ein samen- und pollenbürtiges Virus dar.

Die hier dargestellten Ergebnisse können die Grundlage bilden für eine Vielzahl an epidemiologischen Studien zum CLRV. Die ermittelten umfangreichen Sequenzinformationen bieten die Möglichkeit detaillierte Studien zur Funktion und Struktur der 3'UTR von Nepoviren durchzuführen. Biochemische Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Genombereichen oder zwischen dem Virusgenom und der Pflanzenzelle und der 3'UTR können, aufbauend auf den erschlossenen Daten, den erhaltenen CLRV-Klonen und gesammelten Isolaten untersucht werden. Auch hat diese Arbeit die Ressourcen zur Durchführung gezielter epidemiologischer Studien und genetischer Adaptionstudien für das *Cherry leaf roll virus* und Mechanismen der Virus-Wirt-Koevolution erschlossen.

5 Zusammenfassung

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist ein weltweit verbreitetes Pflanzenvirus, das eine Vielzahl an Laubgehölzen und Stauden infiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden phylogenetische und serologische Analysen der Populationsstruktur des CLRV durchgeführt und ihre Korrelation mit epidemiologischen Faktoren, wie der geographischen Verbreitung und der Wirtspflanzenart, untersucht.

Der Nachweis von CLRV erfolgte mittels Immunocapture - Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion (IC-RT-PCR). Dabei konnte CLRV in 20 verschiedenen Gehölzarten an 33 Standorten in Deutschland nachgewiesen werden. Außerdem wurden Isolate aus 6 anderen Ländern, die von Kollegen zur Verfügung gestellt worden waren, in die Untersuchungen einbezogen. Der Vergleich der Symptomausprägungen auf verschiedenen Testpflanzen zeigte keine auffälligen biologischen Unterschiede bei den gewonnenen CLRV-Isolaten. Untersuchungen zur RNA-Populationsstruktur basierend auf einem 380 bp langen Teilbereichs der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) der genomischen RNA1 und RNA2 zeigte eine homogene Basenzusammensetzung innerhalb der Virusisolate. Hingegen traten zwischen den 73 untersuchten CLRV-Isolaten Sequenzunterschiede bis zu 16,4 % auf. Die phylogenetische Analyse der 3'UTR deckte eine Gruppierung der Virusisolate nach den natürlichen Wirtspflanzenarten auf, die durch statistischen Analysen mittels G_{ST} -Koeffizient bzw. Mantel-Test verifiziert werden konnten. Der Vergleich der phylogenetischen mit der serologischen Gruppierung, die unter der Verwendung monoklonaler Antikörper analysiert wurde, zeigte für 24 CLRV-Isolate eine hohe Korrelation in Bezug auf die Gruppenzuordnung. Auch beim phylogenetischen Vergleich der Hüllprotein-Sequenzen für 9 CLRV-Isolate ergaben sich die gleichen Gruppen. Innerhalb der 380 bp langen 3'UTR wurde mittels Computer-Modellierung der Sekundärstruktur unter Verwendung von 67 CLRV-Sequenzen zwei konservierte Stemloops identifiziert, die die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen und die funktionelle Bedeutung der 3'UTR belegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die genetische Struktur von CLRV-Populationen vor allem durch den Einfluss der natürlichen Wirtspflanzenart bestimmt wird während der Einfluss der geographischen Distanz nur relativ gering ist. Möglicherweise ist die außergewöhnliche Populationsstruktur dieses Virus epidemiologisch begründet, da CLRV im Unterschied zu vielen anderen Pflanzenviren vorrangig durch Pollen und Samen übertragen wird, was artspezifische Übertragungsbarrieren zur Folge hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zum ersten Mal einen Hinweis für eine wirtsbasierende Selektion der Viruspopulation für ein pollenbürtiges Virus dar. Die entwickelten Verfahren haben eine Grundlage für zukünftige detaillierte Untersuchungen zur Evolution und Epidemiologie des CLRV geschaffen.

6 Summary

Cherry leaf roll virus (CLRV) is worldwide distributed and is infecting a variety of deciduous trees and shrubs. In this study phylogenetic and serological analyses of the population diversity of CLRV and the correlation with the epidemiological factors geographical distribution and host plant species, have been investigated.

During a survey in Germany plants were tested by IC-RT-PCR and virus isolates recovered from a range of woody plants from different geographical regions. CLRV was detected in 20 different plant species from 33 locations in Germany. Also isolates from 6 other countries received from colleagues were included in the study. Comparison of symptom expression on different indicator plants did not show obvious biological differences between the recovered CLRV isolates. Investigations of the RNA population structure based on a 380 bp long fragment of the 3'-non-translated region (3'UTR) of genomic RNA1 and RNA2 revealed a homogeneous base composition for single isolates. However, between 73 CLRV isolates 3'UTR sequences showed up to 16.4 % divergence. Phylogenetic analysis of the 3'UTR uncovered a grouping of the virus isolates according to the natural host plant species, which was verified by statistic analyses using G_{ST} coefficient and Mantel test. The comparison of the phylogenetic grouping with the serological grouping of 24 selected CLRV isolates, which was analyzed using a set of seven monoclonal antibodies, showed a high correlation regarding the group arrangement. The phylogenetic comparison of the coat protein sequences for 9 CLRV isolates also revealed the same group arrangement. Secondary structure analysis by computer modelling of the consensus sequence of the 380 bp long 3'UTR using 67 CLRV sequences identified two conserved stem loop regions supporting the results of other authors and indicating the functional significance of the 3'UTR.

The results show that the genetic structure of the CLRV populations is determined particularly by the natural host plant species whereas the influence of the geographical distance is rather small. Possibly the remarkable population structure of CLRV is directly linked to the epidemiology as CLRV is in contrast to many other viruses predominantly transmitted by pollen and seeds imposing effective barriers for interspecies virus transmission. This study represents the first strong report for a host plant based selection of a seed- and pollen-transmitted virus population. The developed molecular tools set the stage for future detailed investigations on the evolution and molecular epidemiology of CLRV.

7 Összefoglalás

A *Cherry leaf roll virus* (CLRV) egy világszerte elterjedt növényvírus, mely nagyszámban fertőzi meg a lombhullató fásszárúakat és az évelő növényeket. A jelenlegi munkában a CLRV populációstruktúrájának filogenetikus és szerológiai analízisét, valamint néhány epidemiológiai tényezővel – többek között a földrajzi elterjedéssel és a gazdanövényekkel – való korrelációjának vizsgálatát végeztük el.

A szimptóma megjelenési formáit Németország különböző területein fásszárúakon vett mintákból bonitáltuk. A CLRV-t IC-RT-PCR-rel mutattuk ki. Ezáltal sikerült a CLRV-t 20 különböző fásszárú fajtán kimutatni, melyek 33 különböző helyről származnak. A különböző tesztnövényeken megfigyelhető szimptómák a kinyert CLRV izolátumoknál nem mutattak feltűnő különbséget. Az RNS1 és RNS2 nem-transzlálódó régióinak (3'UTR) 380 bp hosszúságú részterületére alapuló RNS-populációstruktúrális vizsgálatok során homogén bázissorrendet lehetett megállapítani a vírusizolátumokon belül. Ezzel szemben a 73 megvizsgált CLRV-izolátum között maximum 16,4 %-os szekvenciakülönbség volt kimutatható. Az 3'UTR filogenetikai analízise a vírusizolátumok természetes gazdanövények szerinti csoportfelosztását tárta fel. A G_{ST} -koefficiens illetve a Mantel-teszt segítségével végzett statisztikai analízisek a fenti csoportosulások pozitív korrelációját illetve szignifikációját igazolták a genetikai távolság és a természetes gazdanövényfajták összehasonlításánál. A filogenetikai és szerológiai csoportosulások monoklonális antitestek alkalmazásával végzett összehasonlításánál 24 CLRV-izolátum magas korrelációt mutatott. 9 CLRV-nél a köpenyfehérje (CP) – szekvenciák filogenetikai összehasonlítása ugyancsak ezeket a csoportokat mutatta ki. 67 CLRV-szekvencia 3'UTR-jének 380 bp hosszúságú konszenzusszekvenciájának szekunder-struktúranalízisével lehetett két konzervált *stemloop*-ot azonosítani, amelyek alátámasztják más szerzők vizsgálatait valamint igazolják a 3'UTR funkcionális jelentőségét.

Az eredmények azt mutatják, hogy a CLRV-populációk genetikai struktúráját mindenek előtt a természetes gazdanövények befolyása határozza meg. Ezzel szemben a földrajzi távolság befolyása a CLRV-genomok struktúrájára viszonylag csekély. Ennek a vírusnak a szokatlan populációstruktúrája valószínűleg epidemiológiai alapú, mivel sok más vírustól eltérően a CLRV elsősorban pollenek és magok útján terjed. Ennek a munkának az eredményei utalnak először határozottan egy mag és pollen által terjedő vírus populációjának gazdanövényfüggő szelekciójára. A fejlett szerológiai és molekuláris eszközök jó alapot teremtettek a CLRV evolúciójának és molekuláris epidemiológiájának jövőbeni részletes vizsgálataira.

Schlagwörter:

CLRV, Variabilität, Diversität, Serologie, Sequenz, Populationsstrukturierung,
Diversität, Wirt

Keywords:

CLRV, variability, diversity, serology, sequence, population structure, diversity, host

8 Literaturverzeichnis

- AHMED, A.H. & BAILISS, K.W., 1975: Virus infection of delphinium in Britain. *J. Hort. Sci.* **50**: 47-54.
- ANDERSON, P. K., CUNNINGHAM, A. A., PATEL, N. G., MORALES, F. J., EPSTEIN, P. R. & DASZAK, P., 2004: Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 535-544.
- ANONYMUS, 2003: Import of Olea (Olive) plants. Technical Paper. Biosecurity Australia. http://netenergy.dpie.gov.au/corporate_docs/publications/pdf/market_access/biosecurity/plant/final_olive.pdf.
- BACHER, J. W., WARKENTIN, D., RAMSDELL, D. & HANCOCK, J. K., 1994: Sequenz analysis of the 3' termini of RNA1 and RNA2 of blueberry leaf mottle virus. *Virus Research* **33**: 145-156.
- BATEY, R. T., RAMBO, P. R., DOUDNA, J. A., 1999: Tertiäre Motive bei Struktur und Faltung von RNA. *Angewandte Chemie* **111**: 2472-2491.
- BORJA, M., SANCHEZ, F., ROWHANI, A., BRUENING, G. & PONZ, F., 1995: Long, nearly identical untranslated sequences at the 3' terminal regions of the genomic RNAs of cherry leafroll virus (walnut strain). *Virus Genes* **10**: 245-252.
- BOUSALEM, M., DOUZERY, E. & FARGETTE, D., 2000: High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: A contribution to understanding potyvirus evolution. *J. Gen. Virol.* **81**: 243-255.
- BRAULT, V., HIBRAND, L., CANDRESSE, T., LE GALL, O. & DUNEZ, J., 1989: Nucleotid sequence and genetic organization of Hungarian grapevine chrome mosaic Nepovirus RNA2. *Nucl Acids Res.* **17**: 7809-7819.
- BROOKS, M. & BRUENING, G., 1995a: A subgenomic RNA associated with cherry leafroll virus infections. *Virology* **211**: 33-41.
- BROOKS, M. & BRUENING, G., 1995b: Transient Gene Expression of Antisense RNA and Coat Protein-Encoding Sequences Reduced Accumulation of Cherry Leafroll Virus in Tobacco Protoplasts. *Virology* **208**: 132-141.
- CALLAWAY, A., GIESMAN-COOKMEYER, D., GILLOCK, E. T., SIT, T. L. & LOMMEL, S. A., 2001 The multivunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 419-460
- CLARK, N. F. & ADAMS, A. N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.
- COOPER, J. I., 1976: The possible epidemiological significance of pollen and seed

- transmission in the United Kingdom. *Mitt. Biol. Bundesanstalt* **170**: 17-22.
- COOPER, J. I., 1988: Ecology of viruses in ornamental and forest trees. *Acta Hortic.* **234**: 359-364.
- COOPER, J. I. & ATKINSON, M. A., 1975: Cherry leaf roll virus causing a disease of *Betula* sp. in the United Kingdom. *Forestry* **48**: 193-203.
- COOPER, J. I. & EDWARDS, M. L., 1980: Cherry leaf roll virus in *Juglans regia* in the United Kingdom. *Forestry* **53**: 41-50.
- COOPER, J. I., MASSALSKI, P. R. & EDWARDS, M. L., 1984: Cherry leaf roll virus in the female gametophyte and seed of birch and its relevance to vertical transmission. *Ann. Appl. Biol.* **105**: 55-64.
- CROPLEY, R., 1960: Serological detection of a virus in cherry trees with a leaf roll disease. *Nature*, **188**: 857.
- CROPLEY, R., 1961: Cherry leaf roll virus. *Ann. Appl. Biol.* **49**: 524-529.
- CROPLEY, R. & TOMLINSON, J. A., 1971: Cherry leaf roll virus. *Common. Mycol. Inst., Asocs. Appl. Biol. Descr. Plant Viruses* **80**: 1-4.
- CRUTE, I. R., HOLUB, E. B. & BURDON, J. J., 1997: The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions. *British Society for Plant Pathology*, 427 S.
- DESBIEZ, C., WIPF-SCHEIBEL, C., GRANIER, F., ROBAGLIA, C., DELAUNAY, T. & LECOQ, H., 1996: Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in the island of Martinique. *Plant Dis.* **80**: 203-207.
- DE JONG, W., MISE, K. & AHLQUIST, P., 1994: The multigenic nature of RNA virus adaptation to plants. *Trends Microbiol.* **2**: 29-31.
- DE ZOETEN, G. A., LAURITIS, J. A. & MIRCETICH, S. M., 1982: Cytopathology and properties of cherry leaf roll virus associated with walnut blackline disease. *Ethiology* **72**: 1262-1265.
- DODDS, S. M. & ROBINSON, D. J., 1987: Conservation of the 3'-terminal sequences of the genome RNA species of tomato black ring virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 973-978.
- DUARTE, E., CLARKE, D., MOYA, A., DOMINGO, E. & HOLLAND, J., 1992: Rapid Fitness Losses in Mammalian RNA Virus Clones Due to Muller's Ratchet. *Proc. Nat. Acad. Scie.* **89**: 6015-6019.
- DUGGAL, R., LAHSER, F. & HALL, T. C., 1994: Cis-Acting sequences in the replication of plant viruses with plus-sense RNA genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 287-309.
- EDWARDSON, J. R. & CHRISTIE, R. G., 1978: Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **16**: 31-55.
- EHRET, D. L., ALSANIUS, B., WOHANKA, W., MENZIES, J. G. & UTKHEDE, R., 2001: Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie* **21**: 323-339.
- EWALD, P. W., 1994: Evolution of infectious disease. *Oxford University Press*, 308 S.

- FARKAS, G. L., KIRÁLY, Z. & SOLYMOSY, F., 1960: Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. *Virology* **12**: 408-421.
- FELSENSTEIN, J., 1985: Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FELSENSTEIN, J., 1989: PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- FISCHER, H. & NIENHAUS, F., 1973: Virushemmende Prinzipien in Paprikapflanzen (*Capsicum annuum* L.). *Phytopathol. Z.* **78**: 25-41.
- FORD, R. E., MOLINE, H. E., MCDANIEL, G. L., MAYHEW, D. E. & EPSTEIN, A. H., 1972: Discovery and characterisation of elm mosaic virus in Iowa. *Phytopathology* **62**: 987-992.
- FRANKLIN, R. M., 1996: Purification and properties of replicative intermediates of the RNA bacteriophage R 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 1504-1511.
- FRITSCH, R. & KEGLER, H., 1966: Die Übertragung des Blattrollvirus der Kirsche (cherry leafroll virus) durch Nematoden. *Die Naturwissenschaften* **51**: 299.
- FITSCHEN, J., 1994: Gehölzflora. Ein Buch zum Bestimmen der in Mitteleuropa wildwachsenden und angepflanzten Bäume und Sträucher. *Quelle & Meyer Verlag* Wiesbaden.
- FUCHS, M., FERREIRA, S. & CONSALVES, D., 1997: Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology Online* [<http://www.bspp.org.uk/mppoll> 1997/0116fuchs.
- FULTON, R. W., 1966: Mechanical transmission of viruses of woody plants. *Annu. Rev. Phytopathology* **4**: 79-102.
- GARCÍA-ARENAL, F., FRAILE, A. & MALPICA, J. 2001: Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 157-186.
- GIBBS, M. J., ARMSTRONG, J. S. & GIBBS, A. J., 2000: Sister-Scanning: A Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**: 573-582.
- GIERSIEPEN, R., 1993: Untersuchungen zur Charakterisierung des Kirschenblattrollvirus (CLRV) als Ursache einer Eschenvirose. Diss., Univ. Bonn, 135 S.
- GOODWIN, J. B. & DREHER, T. W., 1998: Transfer RNA mimicry in a new group of positive-strand RNA viruses, the furoviruses: differential aminoacylation between the RNA components of one genome. *Virology* **230**: 113-124.
- GREIF, C., HEMMER, O. & FRITSCH, C., 1988: Nucleotide sequence of tomato black ring virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* **69**: 1517-1529.
- GUYADER, S. & DUCRAY, D. G., 2002: Sequence analysis of *Potato leafroll virus* isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *J. Gen. Virol.* **83**: 1799-

1807.

- HALL, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Wondows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- HAMACHER, J. & QUADT, A., 1991: Light- and electron microscopy studies of cherry leaf roll virus (CLRV) on European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *J. Phytopath.* **131**: 215-226.
- HANADA, K. & HARRISON, B.D., 1977: Effects of virus genotype and temperature on seed transmission of nepoviruses. *Ann. appl.Biol.* **85**: 79-92.
- HANAHAH, D., 1983: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- HANSEN, A. J., 1967: A virus from golden elderberry. *Phytopathology* **57**: 813.
- HANSEN, A. J. & STACE-SMITH, R., 1971: Properties of virus isolated from golden elderberry, *Sambucus nigra aurea*. *Phytopathology* **61**: 1222-1229.
- HARRISON, B. D., MURANT, A. F. & MAYO, M. A., 1972: Evidence of two functional RNA species in Raspberry ringspot virus. *J. Gen. Virol.* **16**: 339-348.
- HARRISON, B. D., MURANT, A. F., MAYO, M. A. & ROBERTS, I. M., 1974: Distribution of determinants for symptom production, host range and nematode transmissibility between the two RNA components of Raspberry ringspot virus. *J. Gen. Virol.* **22**: 233-247.
- HARRISON, B. D. & MURANT, A. F., 1977: Nematode transmissibility of pseudorecombinant isolates of Tomato black ring virus. *Ann. appl. Biol.* **86**: 209-212.
- HARRISON, B. D. & ROBINSON, D. J., 1988: Molecular variation in vector-borne plant viruses: Epidemiological significance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **321**: 447-462.
- HERRERA, G. & MADARIAGA, M., 2001: Presence and incidence of grapevine viruses in the central zone of Chile. *Agricultura Técnica*: **61**: 393-400.
- HOFACKER, I. L., 2003: Vienna RNA secondary structure server *Nucleic Acids Research* **31**: 3429-3431.
- HOFACKER, I. L., FEKETE, M., FLAMM, C., HUYNEN, M. A., RAUSCHER, S., STOLORZ, P. E. & STADLER, P. F., 1998: Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3825–3836.
- HOFACKER, I. L., STOCSITS, R. & STADLER, P. F., 2004: Conserved RNA Secondary Structures in Viral Genomes: A Survey. *Bioinformatics* **20**: 1495-1499.
- HOLLAND, J. & DOMINGO, E., 1998: Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**: 13-21.
- HORNE, R.W. & WILDY, P. 1963: Virus structure revealed by negative staining. *Adv. Virus Res.* **10**: 101-170.
- HORVÁTH, J., 1979: New Artificial Hosts and Non-Hosts of Plant Viruses and their Role in the Identification and Separation of Viruses: XIII. Nepovirus Group (CLRV Subgroup): Cherry Leaf Roll Virus. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **14**: 319-

326.

- HORVÁTH, J., SCHMELZER, K. & JURETIĆ, N. 1974: Isolierung des Kirschenblattroll-Virus (cherry leaf roll virus) aus *Sambucus nigra* L. aus Ungarn. *Acta. Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **9**: 209-218.
- HULL, R., 2002: Matthews' plant virology, Fourth Edition. Academic Press, London, UK
- HURST J. C., LINDQUIST, H. D. A. 2000. Defining the ecology of viruses. S. 3-40. In: Viral ecology. C. J. Hurst (ed.) *Academic Press*, London.
- IWANAMI, T., KONDO, Y., KOBAYASHI, M., HAN, S. S. & KARASEV, A. V. 2001. Sequence diversity and interrelationship among isolates of satsuma dwarf-related viruses. *Arch. Virol.* **146**: 807-813.
- JEGER, M. J., VAN DEN BOSCH, F., MADDEN, L. V. & HOLT, J., 1998: A model for analysing plant-virus transmission characteristics and epidemic development. *Mathematical Medicine and Biology* **15**: 1-18.
- JOHANSEN, E., EDWARDS, M.C. & HAMPTON, R. O., 1994: Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**: 363-386.
- JONES, A. T., 1972: Purification and properties of elderberry latent virus, one of four sap-transmissible viruses obtained from American elder (*Sambucus canadensis* L.). *Ann. Appl. Biol.* **70**: 49-58.
- JONES, A. T., 1973: A comparison of some properties of four strains of cherry leaf roll virus. *Ann. Appl. Biol.* **74**: 211-217.
- JONES, A. T., 1976: Serological specificity of isolates of cherry leaf roll virus from different natural hosts. *Poljopr. znan. smotra* **39**: 527-532.
- JONES, A. T., 1985: Cherry leaf roll virus. CM/AAB Description of plant viruses, 306
- JONES, A. T. & MURANT, A. F., 1971: Serological relationship between cherry leaf roll virus, elm mosaic virus and golden elderberry viruses. *Ann. Appl. Biol.* **69**: 11-15.
- JONES, A. T. & WOOD, G. A., 1978: The occurrence of cherry leaf roll virus in red raspberry in New Zealand. *Pl. Dis. Rep.* **62**: 835-838.
- JONES, A. T., McELROY, F. D. & BROWN, D. J. T., 1981: Test for transmission of cherry leaf roll virus using Longidorus, Paralongidorus and Xiphinema nematodes. *Ann. Appl. Biol.* **99**: 143-150.
- JONES, A. T., KOENIG, R., LESEMANN, D.-E., HAMACHER, J., NIENHAUS, F. & WINTER, S., 1990: Serological comparison of isolates of cherry leaf roll virus from diseased beech and birch trees in a forest decline area in Germany with other isolates of the virus. *J. Phytopathology* **129**: 339-344.
- JOŃCZYK, M., BORODYNKO, N. & POSPIESZNY, H., 2004: Restriction analysis of genetic variability of Polish isolates of Tomato black ring virus. *Acta Biochemica Polonica* **51**: 673-681.
- KEGLER, H., RICHTER, J. & SCHMIDT, H.-B., 1966: Untersuchungen zur Identifizierung und

- Differenzierung des Blattrollvirus der Kirsche (cherry leaf roll virus). *Phytopath. Z.* **56**: 311-330.
- KRAUSE-SAKATE, R., LE GALL, O., FAKKFAKH, H., PEYPELUT, M., MARRAKCHI, M., VARVERI, C., PAVAN, M. A., SOUCHE, S., LOT, H., ZERBINI, F. M. & CANDRESSE, T. 2002: Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* **92**: 563-572.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I. B. & NEI, M., 2001: MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- LARSEN, R. C., GERGERICH, R. C. & KIM, K. S., 1990: Characterization and ultrastructural studies of a nepovirus from *Euonymus*. *Phytopathology* **80**: 134-140.
- LE GALL, O., CANDRESSE, T., BRAULT, V. & DUNEZ, J. 1989: Nucleotide sequence of Hungarian grapevine chrome mosaic nepovirus RNA1. *Nucl. Acids Res.* **17**: 7795-7807.
- LE GALL, O., CANDRESSE T. & DUNEZ, J., 1995: Transfer of the 3' non-translated region of *Grapevine chrome mosaic virus* RNA-1 by recombination to *Tomato black ring virus* RNA-2 in pseudorecombinant isolates. *J. Gen. Virol.* **76**: 1285-1289.
- LEHTO, K., LEMMETTY, A. & KERÄNEN, M., 2004: The long 3' non-translated regions of Blackcurrant reversion virus RNAs are highly conserved between virus isolates representing different phenotypes and geographic origins. *Arch. Virol.* **149**: 1867-1875.
- LIANG, X.-Z., LEE, B. T. K. & WONG, S.-M., 2002: Covariation in the Capsid Protein of Hibiscus Chlorotic Ringspot Virus Induced by Serial Passaging in a Host That Restricts Movement Leads to Avirulence in Its Systemic Host. *J. Virol.* **76**: 12320-12324.
- LISTER, R. M. & MURANT, A. F., 1967: Seed-transmission of nematode-borne viruses. *Ann. Appl. Biol.* **59**: 49-62.
- MANTEL, N., 1967: The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209-220.
- MAINOLFI, P., 2001: Norme fitosanitarie e commercializzazione dei materiali di moltiplicazione di ortaggi e fruttiferi. Progetto POM A 32. Locorotondo (BA). Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Roma.
- MALIOGA, B., DOVAS, C. I., EYTHIMIOU, K. & KATIS, N. I., 2004: Generic detection of Comoviridae species by a nested RT-PCR using dl-containing primers. EMBL DNA Sequence Database. European Bioinformatics Institute (EBI). Accession numbers: AJ616714.
- MANDAHAR, C. L. & Gill, P. S., 1984: The epidemiological role of pollen transmission of viruses. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **91**: 246-249.
- MARTELLI, G. P. & Russo, M., 1977: Plant virus inclusion bodies. *Adv. Virus Res.* **21**: 175-

266.

- MARTIN, R. R., DELANO, J. & LÉVESQUE, C. A. 2000: Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**: 207-239.
- MARTIN, D. & RYBICKI, E., 2000: RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. **16**: 562-563.
- MASSALSKI, P. R. & COOPER, J. I., 1984: The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut, cherry naturally infected with CLRV and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant. Path.* **33**: 255-262.
- MAYHEW, D. E. & EPSTEIN, A. H., 1971: Elm mosaic virus in Iowa. *Phytopathology* **61**: 1024.
- MAYNARD SMITH, J. 1992: Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* **34**: 126-129.
- MCCASKILL, J.S., 1990: The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers*, **29**: 1105-1119.
- MCGUIRE, G. & WRIGHT, F., 1998: TOPAL: Recombination detection in DNA and protein sequences. *Bioinformatics* **14**: 219-220.
- MCGUIRE, G. & WRIGHT, F., 2000: TOPAL 2.0: Improved detection of mosaic sequences within multiple alignments. *Bioinformatics* **16**: 130-134.
- MCNEIL, J. E., FRENCH, R., HEIN, G. L., BAEZINGER, P. S. & ESKRIDGE, K. M., 1996: Characterization of genetic variability among natural populations of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology* **86**: 1222-27.
- MINK, G. I., 1993: Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 375-402.
- MIRCETICH, S. M., SANBORN, R. R. & Ramos, D. E., 1980: Natural spread, graft-transmission, and possible ethiology of walnut blackline disease. *Phytopathology* **72**: 988.
- MORSE, S. S., 1993: Emerging Viruses. Oxford University Press, INC., 203-218.
- MUELLER, W. C., 1967: Tobacco mosaic virus obtained from diseased wisteria and elder. *Plant Dis. Repr.*, **51**: 1053-1054.
- MUKASA, S. B., RUBAIHAYO, P. R. & VALKONEN, J. P. T., 2003: Sequence variability within the 3'-proximal part of the Sweet potato mild mottle virus genome. *Arch. Virol.* **148**: 487-496.
- MURANT, A. F., TAYLOR, M., DUNCAN, G. H. & RASCHKE, J. H., 1981: Improved Estimates of Molecular Weight of Plant Virus RNA by Agarose Gel Electrophoresis and Electron Microscopy after Denaturation with Glyoxal. *J. Gen. Virol.* **53**: 321-332.
- NARAGHI-ARANI, P., DAUBERT, S. & ROWHANI, A., 2001: Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. *J. Gen. Virol.*, **82**: 1791-1795.
- NEI, M., 1972: Genetic distance between populations. *Ann. Nat.* **106**: 283-292.
- NEI, M., 1987: Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 190-191.

- NIENHAUS, F. & HAMACHER, J., 1990: Virosen in Eschen. *Allg. Forst Zeitschr.* **45**: 385-386.
- NÓVÁK, J. B. & LANZOVÁ, 1975: Etiology of two virus diseases of lilac (*Syringa vulgaris* L.) occurring in Czechoslovakia. *Biologia Plantarum (Praha)* **17**: 226-227.
- NOUEIRY, A. O. & AHLQUIST, P., 2003: Brome mosaic virus RNA replication. Revealing the Role of the Host in RNA Virus Replication. *Annu. Rev. Phytopath.* **41**: 77-98.
- OHSHIMA, K., YAMAGUCHI, Y., HIROTA, R., HAMAMOTO, T., TOMIMURA, K., TAN, Z., SANO, T., AZUHATA, F. WALSH, J. A., FLETCHER, J. CHEN, J., GERA, A. & GIBBS, A., 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* **83**: 1511-1521.
- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C. M., 1999: Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**: 218-225.
- PERRIERE, G. & GOUY, M., 1996: WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**: 364-369.
- PIMENTEL, D., LACH, L., ZUNIGA, R & MORISSON, D., 2000: Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States. *BioScience* **50**: 53-65.
- POLÁK, Z., PROCHÁZKOVÁ, Z. & BRANIŠOVÁ, H., 1990: Recent findings of viruses of forest trees in the territory of the Czech Republic. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* **26**: 389-393.
- POSADA, D., 2002: Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 708-717.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A., 2001: Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13757-13762.
- QI, Y. & DING, B., 2002: Replication of *Potato spindle tuber viroid* in Cultured Cells of Tobacco and *Nicotiana benthamiana*: The Role of Specific Nucleotides in Determining Replication Levels for Host Adaptation. *Virology* **302**: 445-456.
- QUACQUARELLI, A. & SAVINO, V., 1977: Cherry leaf roll virus in walnut. II. Distribution in Apulia and transmission through seed. *Phytopathol. Medit.* **16**: 154-156.
- QUADT, A., 1994: Untersuchungen an Laubbäumen unter Streßeinfluß durch Viren und abiotischen Faktoren. Diss. Univ. Bonn, 163 S.
- RAMSDELL, D. C. & STACE SMITH, R., 1983: Blueberry leaf mottle virus, CMI/AAB *Descr. Pl. Viruses* **267**: 4 S.
- RANDLES, J. W., HARRISON, B. D., MURANT, A. F. & MAYO, M. A., 1977: Packaging and biological activity of the two essential RNA species of Tomato black ring virus. *J. Gen. Virol.* **36**: 187-193.
- REBENSTORF, K., 2002: Untersuchungen zur serologischen und molekularen Charakterisierung verschiedener Isolate des Kirschenblattrollvirus (CLRV). Diplomarbeit, HU-Berlin. 101 S.

- REVERS, F., LE GALL, O., CANDRESSE, T. & MAULE, A. J., 1999: New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 367-376.
- RITZENTHALER, C., VIRY, M., PINCK, M., MARGIS, R., FUCHS, M. & PINCK, L., 1991: Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA-1. *J. Gen. Virol.* **72**: 2357-2365.
- RODRÍGUEZ-CEREZO, E., MOYA, A. & GARCÍA-ARENAL, F., 1989: Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. *J. Virol.* **63**: 198-203.
- ROOSSINCK, M., J. LEE, Z. & HELLWALD, K., 1999: Rearrangements in the 5' untranslated region and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* **73**: 6752-6758.
- ROOSSINCK, M. J., 1997: Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 191-209.
- ROTHMALER, W., 1996: Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundbuch. Band 2. *Gustav Fischer Verlag* Jena.
- ROTT, M. E., TREMAINE, J. H. & ROCHON, D. M., 1991a: Nucleotide sequence of tomato ringspot virus RNA-2. *J. Gen. Virol.* **72**: 1505-1514.
- ROTT, M. E., TREMAINE, J. H. & ROCHON, D. M., 1991b: Comparison of the 5' and 3' termini of tomato ringspot virus RNA1 and RNA2: evidence for RNA recombination. *Virology* **185**: 468-472.
- ROWHANI, A., MIRCETICH, S. M., SHEPHERD, R. J. & CUCUZZA, J. D., 1985: Serological detection of cherry leaf-roll virus in English walnut *Juglans regia* trees. *Phytopathology* **75**: 48-52.
- ROWHANI, A. & MIRCETICH, S. M., 1988: Pathogenicity on walnut and serological comparisons of cherry leafroll virus strains. *Phytopathology* **78**: 817-820.
- RUBIO, L., SOONG, J., KAO, J. & FALK, B. W., 1999: Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: lettuce infectious yellows virus (LIYV), cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus (BPYV). *Phytopathology* **89**: 707-711.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- SALMINEN, M. O., CARR, J. K., BURKE, D. S. & MCCUTCHAN, F. E., 1995: Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**: 1423-1425.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989: Molecular Cloning, Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SANJUAN, R., MOYA, A. & ELENA, S. F., 2004: The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**: 8396-

8401.

- SAVINO, V. & GALLITELLI, D., 1981: Cherry leaf roll virus in Olive. *Phytopath. medit.* **20**: 203-205.
- SAVINO, V., QUACQUARELLI, A., GALLITELLI, D., PIAZZOLLA, P. & MARTELLI, G.P., 1977: Il virus dell' accartocciamento fogliare del Ciliegio nel Noce. I. Identificazione e caratterizzazione. *Phytopath. medit.* **16**: 96-102.
- SCHIMANSKI, H. H., SCHMELZER, K. & ALBRECHT, H. J. 1975a: Die Spätblühende Traubenkirsche (*Prunus serotina* Ehrh.) als natürlicher Wirt des Kirschenblattrollvirus. *Arch. Phytopathol. U. Pflanzenschutz Berlin* **11**: 329-334.
- SCHIMANSKI, H. H., SCHMELZER, K., KEGLER, H. & ALBRECHT, H. J., 1975b: Wildwachsende *Prunus*-Arten der Untergattungen *runophora* und *padus* als natürliche Wirtspflanzen für Kirschenringflecken-Viren. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2*, **130**: 109-120.
- SCHIMANSKI, H. H., 1987: Investigation concerning seed transmissibility of Tomato black ring virus in Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) and European elder (*Sambucus nigra* L.). *Zentralbl. Mikrobiol.* **142**: 477-481.
- SCHMELZER, K., 1966: Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. *Phytopath. Z.* **55**: 317-351.
- SCHMELZER, K., 1972a: Das Kirschenblattrollvirus aus der Birke (*Betula pendula* Roth.). *Zbl. Bakt. Z. Abt. II* **127**: 10-12.
- SCHMELZER, K., 1972b: Nachweis der Verwandtschaft zwischen Herkünften des Kirschenblattroll-Virus (cherry leaf roll virus) und dem Ulmenmosaik-Virus (elm mosaic virus). *Zbl. Bakt. Z. Abt.* **127**: 140-144.
- SCHNEIDER, W. L. & ROOSSNICK, M. J., 2001: Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virol.* **75**: 6566-6571.
- SCHOLTHOF, K.-B. G., 2004: Tobacco mosaic virus: A Model System for Plant Biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 13-34.
- SCHUSTER, C. E. & MILLER, P.W., 1933: A disorder of Persian (English) walnut grafted on black walnut stocks, resulting in girdling. *Phytopathology* **23**: 408-409.
- SCOTT, N. W., COOPER, J. I., LIU, Y. Y. & HELEN, C. U. T., 1992: A 1.5 kb sequence homology in 3-terminal regions of RNA-1 and RNA-2 of a birch isolate of cherry leaf roll nepovirus is also present in part, in a rhubarb isolate. *J. Gen. Virol.* **73**: 481-485.
- SCOTT, N. W., COOPER, J. I. & EDWARDS, M. L., 1993: The identification, cloning, and sequence analysis of the coat protein coding region of a birch isolate (I2) of cherry leaf roll nepovirus. *Arch. Virol.* **131** (1-2): 209-215.
- SONG, C. & SIMON, A. E., 1995: Requirement of a 3'-Terminal Stem-Loop in *in Vitro* Transcription by an RNA-dependent RNA-Polymerase. *J. Mol. Biol.* **254**: 6-14.

- TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M. & WOOLHOUSE, M. E. J., 2001: Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356: 983–989.
- THOMPSON, J. D., GIPSON, T. J., PLEWANIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G., 1997: The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- TÓBIÁS, I., 1995. Characterization of different *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates. *Hort. Sci.* **27**: 69-73.
- TOMIMURA, K., ŠPAK, J., KATIS, N., JENNER, C. E., WALSH, J. A., GIBBS, A.J. & OHSHIMA, K. 2004. Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. *Virology* **330**: 408-423.
- TOMLINSON, J. A. & WALKEY, D. G. A., 1967: The isolation and identification of rhuburb viruses occurring in Britain. *Ann. Appl. Biol.* **59**: 415-427.
- UYEMOTO, J. K., GILMER, R. M. & WILLIAMS, E., 1971: Sap-transmissible viruses of elderberry in New York. *Pl. Dis. Reprtr.* **55**: 913-916.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CARSTENS, E. B., ESTES, M. K., LEMON, S. M., MANIHOFF, J., MAYO, M. A., MCGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R. & WICKNER, R. B., 2000: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press.
- VARNEY, E. H., & MOORE, J. D., 1952: Stain of tomato ringspot virus from American elm. *Phytopathology* **42**: 476-477.
- VIGNE, E., BERGDOLL, M., GUYADER, S. & FUCHS, M. 2004: Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J. Gen. Virol.* **85**: 2435-2445.
- WALKEY, D. G. A. & STACE-SMITH, R., 1972: Properties of cherry leaf roll virus. *Phytopathology* **62**: 796.
- WALKEY, D. G. A. & WEBB, M. J. W., 1970: Tubular inclusion bodies in plants infected with viruses of the NEPO type. *J. Gen. Virol.* **7**: 159-166.
- WALKEY, D. G. A. & WEBB, M. J. W., 1968: Virus in plant apical meristems. *J. Gen. Virol.* **3**: 311-313.
- WALKEY, D. G. A., STACE-SMITH, R. & TREMAINE, J. H., 1973: Serological, physical and chemical properties of strains of cherry leaf roll virus. *Phytopathology* **63**: 566-571.
- WANG, S., GERGERICH, R. C., WICKIZER, S. L. & KIM, K. S., 2002: Localization of transmissible and nontransmissible viruses in the vector nematode *Xiphinema americanum*. *Phytopathology* **92**: 646-653.
- WANG A. & SANFAÇON, H., 2000: Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA1-encoded polyprotein *in*

- vitro. J. Gen. Virol.* **81**: 2771-2781.
- WATERWORTH, H. E. & LAWSON, R. H., 1973: Purification, electron microscopy, and serology of the dogwood ringspot strain of cherry leaf roll virus. *Phytopathology* **63**: 141-146.
- WERNER, R., MÜHLBACH, H.-P. & BÜTTNER, C., 1997a: Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRNV) in birch, beech and petunia by immunocapture RT-PCR using a conserved primer pair. *Eur. J. For. Pathol.* **27**: 309-318.
- WHEELER, A. G., 1976: Life history of *Kleidocerys resedae* in European white birch and Ericaceous shrubs. *Ann. Ent. Soc. Am.* **69**: 459-463.
- WINTER, S. & NIENHAUS, F., 1989: Identification of viruses from European beech (*Fagus sylvatica* L.) of declining forests in Northrhine-Westfalia (FRG). *Eur. J. For. Pathol.* **19**: 111-118.
- WORMS, G. & NIENHAUS, F., 1975: Charakterisierung und Wirkung eines virushemmenden Polysaccharids aus Kohlpflanzen. *Phytopathol. Z.* **82**: 224-245.
- YAMASHITA K. & FUKUI, Y. 2004: EMBL DNA Sequence Database. European Bioinformatics Institute (EBI). Accession numbers: AB168098, AB168099, AB168100.
- ZHAN, J., MUNDT, C. C., HOFFER, M. E. & McDONALD, B. A., 2002: Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J. Evol. Biol.* **15**: 634-647.
- ZAITLEIN, M. & HULL, R., 1987: Plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 291-315.
- ZHOU, Y., CIVEROLO, E. L. & MELVIN, J. A., 1998: Comparative nucleotide sequences of the coat protein-encoding region of the genomes of Cherry leaf roll virus strains infecting walnut. *Acta Hort.* **472**: 321-324.
- ZUKER, M. & STIEGLER, P., 1981: Optimal computer folding of larger RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**: 133-148.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
CA	Kanada
cDNA	komplementäre DNA
CLRV	<i>Cherry leaf roll nepovirus</i>
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIECA	Diethyldithiocarbamic acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Etbr	Etidiumbromid
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
F	Frankreich
g	Gramm (bei Massen)
g	Erdbeschleunigung
UK	United Kingdom
H	Ungarn
IC-RT-PCR	Immunocapture - Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion
IgG	Immunoglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ISEM	Immuno-Sorbent-Elektronenmikroskopie
KeV	Kiloelektronenvolt
kb	Kilobasen
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar, mol pro Liter
mAb	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
NaAc	Natriumacetat
NL	Niederlande
NZ	Neuseeland
OD _{260/230}	Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und 230 nm gemessen
pAb	Polyklonaler Antikörper

PCR	Polymerase Chain Reaction
PPK	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAS-ELISA	Triple Antibody Sandwich - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit (Einheit)
UAc	Uranylacetat
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
3'UTR	3'-terminaler untranslatierte Genombereich

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Pflanzenarten, Kurzbezeichnung (Eingangsnummer), Herkunft und Zeitpunkt der Probenahme	10
Tab. 2: Originale Feldproben (O) und CLRV-Isolate (I), die von verschiedenen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt worden sind.	14
Tab. 3: Synthetische Oligonukleotide, deren Orientierung, Nukleotidsequenz und Referenz	17
Tab. 4: Zusammenstellung der chemischen Bekämpfungsmittel, deren Aufwandmengen und Wirkung	19
Tab. 5: Zusammenstellung aller gesammelten Gehölz- und Staudenarten, die auf eine CLRV-Infektion untersucht wurden, unter Angabe des Jahres der Probenahme, der Standorte, der Anzahl der getesteten Pflanzen und der IC-RT-PCR-Testergebnisse.....	41
Tab. 6: Vergleich der Sequenzen der 3'UTR (380 bp) von CLRV-Isolaten (I) und Feldproben (O) nach wiederholter Vermehrung in der Indikatorpflanze <i>Chenopodium quinoa</i>	54
Tab. 7: Genetische Distanz innerhalb und zwischen den phylogenetischen Gruppen, errechnet mit dem Programm MEGA2 für 280 bp der 3'UTR von CLRV-Proben.....	59
Tab. 8: Sequenzdiversitäten innerhalb und zwischen den phylogenetischen Gruppen, errechnet im Vergleich der Nukleotid- (1539 nt - 1545 nt) und Aminosäure- (512 aa - 515 aa) Sequenzen mit dem Programm ClustalX	62
Tab. 9: Vergleichende Analyse der genetischen Diversität des 3'UTR von CLRV-Subpopulationen definiert anhand verschiedener epidemiologischer Parameter.....	71
Tab. 10:Reaktivität von 24 CLRV-Isolaten im TAS-ELISA unter der Verwendung von 7 monoklonalen Antikörpern.	82

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Geographische Herkünfte aller Feldproben und CLRV-Isolate in Deutschland.....	42
Abb. 2: Mittels IC-RT-PCR für CLRV positiv getestete Insektenarten.....	43
Abb. 3: Typische Symptomausprägungen auf Blättern CLRV-infizierter Gehölze.....	45
Abb. 4: Symptomausprägung auf CLRV-infizierten Indikatorpflanzen.	46
Abb. 5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Blatthomogenaten CLRV-infizierter Pflanzen.....	47
Abb. 6: PCR-Testreihe mit verschiedenen Primeranlagerungs-Temperaturen und MgCl ₂ -Konzentrationen zur Optimierung der PCR-Bedingungen.....	49
Abb. 7: PCR-Produkte der CLRV-Verdünnungsreihe im 1 %igen Agarose-Gel zur Bestimmung der Nachweisgrenze der optimierten IC-RT-PCR zum Massen- Screening.	50
Abb. 8: Amplifikate der unter der Verwendung der Primer RW1 und RW2 durchgeführten IC-RT-PCR verschiedener CLRV-Isolate und Herkünfte nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarose-Gel.....	52
Abb. 9: Phylogenetische Analyse, basierend auf dem Vergleich von 73 CLRV- Sequenzen der 3'UTR mit einer Länge von 280 bp, amplifiziert von Originalproben und Isolaten von unterschiedlichen Wirtspflanzenarten und Herkünften.	58
Abb. 10: PCR-Produkte der IC-RT-PCR von 29 verschiedenen CLRV-Isolaten unter Verwendung der Hüllproteinregion begrenzenden Primer CP1 und CP2 nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarose-Gel.....	61
Abb. 11: Vergleich der Hüllprotein kodierenden Aminosäuresequenz von 9 verschiedenen CLRV-Isolaten aus 3 unterschiedlichen Gehölzgattungen.....	64
Abb. 12: Phylogenetische Analyse der 512 bis 515 Aminosäuren langen CLRV- Hüllprotein-Sequenz von neun verschiedenen Isolaten aus den drei Wirtspflanzenarten Walnuss, Schwarzer Holunder und Sand-Birke.	65
Abb. 13: Rekombinationsanalyse der Hüllproteinsequenzen mittels RDP.	66
Abb. 14: Ausschnitt des Sequenzvergleichs der CP-Nukleotidsequenz von 9 CLRV- Isolaten.....	67
Abb. 15: Schematische Darstellung des CLRV-Genoms.....	67
Abb. 16: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen innerhalb der bekannten Sequenzbereiche auf der RNA2 des CLRV-Isolats E603	68
Abb. 17: 3305 bp lange Nukleotidsequenz des Holunder-Isolats E603	69
Abb. 18: Statistischer Vergleich mittels Mantel-Test zwischen der genetischen Diversität der 3'UTR von CLRV-Proben (380 bp) in Bezug auf ihre natürliche Wirtspflanze und die geographische Entfernung	74

Abb. 19: Sekundärstruktur der Konsensussequenz aus 67 CLRV-Sequenzen einer Länge von 380 bp innerhalb der 3'UTR.....	78
Abb. 20: Mountain Plot der 380 bp langen Konsensussequenz innerhalb der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region des CLRV-Genoms erstellt mit ClustalX und Vienna RNA Package.	79
Abb. 21: Sekundärstrukturanalyse der 23 bp langen Konsensussequenz innerhalb der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region des CLRV-Genoms erstellt mit ClustalX und Vienna RNA Package.	80
Abb. 22: Vergleich der Ergebnisse der mAb-Analyse unter Verwendung von einem polyklonalen (pAb) und sieben monoklonalem Antikörpern (mAbs), produziert gegen das Walnuss-CTIFL-Isolat aus Frankreich, mit dem phylogenetischen Stammbaum nach Analyse 380 bp langer Sequenzabschnitte innerhalb der 3'UTR des CLRV-Genoms.	84

12 Anlagenverzeichnis

- Tab. A1: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Pflanzenarten, Herkünfte, Symptome und Kurzbezeichnung.
- Tab. A2: Liste aller zur Verfügung gestellter Proben und Isolate, Eingangsnummer, Wirtspflanze, Herkunft, Lagerung, PCR-Ergebnisse, Anzahl der Klone zur Sequenzauswertung.
- Tab. A3: Cherry leaf roll virusinfizierte Proben und Isolate, die in die Untersuchungen einbezogen wurden. Die Tabelle beinhaltet Informationen über Bezeichnung, Wirtspflanze, geographische Herkunft, Jahr der Isolierung bzw. Probenahme und Zugangsnummer.
- Abb. A1: Symptombilder auf eine CLRV-Infektion untersuchter virusverdächtiger Blattproben verschiedener Gehölze und Stauden. Alle Proben erwiesen sich in der IC-RT-PCR als negativ für eine CLRV-Infektion mit Ausnahme von Weinrebe.
- Abb. A2: Phylogenetischer Stammbaumvergleich basierend auf 380 bp (links) und 280 bp (rechts) umfassenden Sequenzabschnitten im 3'-terminalen nicht-kodierenden hochkonservierten Genombereich von CLRV-Isolaten verschiedener Wirte und Herkünfte
- Abb. A3: Sequenzvergleich 380 bp langer Sequenzen innerhalb der 3'UTR von 67 CLRV-Isolaten
- Abb. A4: Nukleotidsequenz der Hüllproteinregion von 9 verschiedenen CLRV-Isolaten
- Abb. A5: Sequenzvergleich der vollständigen 3'UTR von 3 CLRV-Isolaten
- Abb. A6: RNA-Sekundärstruktur von verschiedenen CLRV-Sequenzen innerhalb der 3'UTR (380 bp)

13 Anhang

Tab. A1: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Pflanzenarten, Herkünfte, Symptome und Kurzbezeichnung

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
1	E119	<i>Sambucus nigra</i>	09.05.2001	Berlin-Zehlendorf-1 (Lentzeallee Z)	chlorotische Ringflecken	-	-	+	4
2	E120	<i>Betula pendula</i>	25.05.2001	Berlin-Spandau	chlorotische Bänderungen	+	nt	+	6
3	E121	<i>Betula pendula</i>	25.05.2001	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitter Str.)	chlorotische Bänderungen, verkleinerter Blattdurchmesser	-	-	+	PCR
4	E135	<i>Betula pendula</i>	06.06.2001	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	-	-	+	PCR
5	E137	<i>Betula pendula</i>	06.06.2001	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	-	-	-	-
6	E138	<i>Fraxinus excelsior</i>	07.06.2001	Fellinghausen	schwache chlorotische Aufhellungen zwischen den Blattadern	-	-	-	-
7	E139	<i>Fagus sylvatica</i>	07.06.2001	Fellinghausen	Interkostal-Chlorose	-	-	-	-
8	E140	<i>Sambucus nigra</i>	06.06.2001	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	-	nt	+	PCR
9	E141	<i>Carpinus betulus</i>	06.06.2001	Fellinghausen	schwache Interkostal-Chlorose	-	nt	+	PCR
10	E142	<i>Betula pendula</i>	06.06.2001	Fellinghausen	chlorotische Bänderungen	-	nt	-	-
11	E143	<i>Betula pendula</i>	06.06.2001	Fellinghausen	Chlorosen	-	nt	-	-
12	E157	<i>Sambucus nigra</i>	06.06.2001	Budapest (H)	chlorotische Sprenkelungen	-	nt	-	-
13	E158	<i>Betula pendula</i>	11.06.2001	Berlin-Tempelhof	Bänderungen vom Blattrand ausgehend, im Interkostalbereich parallel zu den Blattadern	-	nt	-	-
14	E160	<i>Betula pendula.</i>	11.06.2001	Berlin-Neukölln	chlorotische Bänderungen	-	nt	+	PCR
15	E161	<i>Betula pendula</i>	11.06.2002	Berlin-Neukölln	chlorotische Ringflecken, verkleinerte Blätter	-	nt	-	-
16	E431	<i>Ulmus laevis</i>	15.05.2002	Meisdorf	chlorotische Aufhellungen	-	nt	-	-
17	E433	<i>Carpinus betulus</i>	15.05.2002	Meisdorf	chlorotische Aufhellungen	-	nt	-	-

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
18	E435	<i>Acer pseudoplatanus</i>	15.05.2002	Meisdorf	starke chlorotische Bänderungen	-	-	-	-
19	E436	<i>Sorbus aucuparia</i>	15.05.2002	Meisdorf	chlorotische Ringflecken	-	isometrische Partikel (30 nm)	-	-
20	E437	<i>Betula pendula</i>	16.05.2002	Aschersleben	chlorotische Bänderungen, flächige Aufhellungen	-	-	-	-
21	E438	<i>Sambucus nigra</i>	16.05.2002	Aschersleben	Aufhellungen zw. Blattadern, leichte Ringe	-	leicht flexible filamentöse Partikel (600 nm)	-	-
22	E439	<i>Hedera helix</i>	16.05.2002	Aschersleben	an evtl. infizierter Birke rankend, leichte chlorotische Linien, Blattdeformation	-	-	-	-
23	E440	<i>Sambucus nigra</i>	15.05.2002	Meisdorf	chlorotisch	-	leicht flexible filamentöse Partikel (300 nm)	-	-
24	E441	<i>Sambucus nigra</i>	15.05.2002	Aschersleben	starke chlorotische Scheckungen	+	leicht flexible filamentöse Partikel (300 nm)	+	2
25	E442	<i>Betula pendula</i>	17.05.2002	Berlin-Neukölln	deutliche chlorotische Flecken und Linienmuster	-	-	-	-
26	E443	<i>Sambucus nigra</i>	20.05.2002	Berlin-Neukölln	chlorotische Scheckungen	+	leicht flexible filamentöse Partikel (300 nm - 750 nm), isometrische Partikel	+	2
27	E444	<i>Carpinus betulus</i>	20.05.2002	Berlin-Neukölln	chlorotische Aufhellungen zwischen Blattadern	-	-	-	-
28	E445	<i>Betula pendula</i>	20.05.2002	Berlin-Neukölln	keine Symptome, gleicher Baum wie E160	-	-	-	-
29	E446	<i>Fagus sylvatica</i>	20.05.2002	Berlin-Neukölln	schwache Aufhellung zw. Blattadern	-	starre Stäbchen (200 nm)	-	-
30	E448	<i>Syringa vulgaris</i>	20.05.2002	Berlin-Neukölln	deutlich abgegrenzte chlorotische Ringflecken und Linien	-	-	-	-
31	E484	<i>Carpinus betulus</i>	29.05.2002	Fischland/Darß	schwache Interkostal-Chlorose	-	nt	-	-
32	E485	<i>Sambucus nigra</i>	29.05.2002	Fischland/Darß	starke Chlorosen	+	isometrische Partikel (30 nm)	+	3
33	E491	<i>Sambucus nigra</i>	05.06.2002	Siófok (Ungarn)	chlorotische Ringflecken und Aufhellungen zwischen Blattadern	-	Bakterien	-	-
34	E492	<i>Sambucus nigra</i>	06.06.2002	Sümeg (Ungarn)	chlorotische Ringflecken und Aufhellungen zwischen Blattadern	+	isometrische Partikel	+	2
35	E493	<i>Syringa vulgaris</i>	08.06.2002	Berlin-Neukölln	chlorotische Bänderung	-	-	-	-
36	E498	<i>Ulmus minor</i>	09.06.2002	Berlin-Zehlendorf-3 (Berkaer Str.)	chlorotische Ringflecken	-	leicht flexible Stäbchen (400 nm)	-	-

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
37	E499	<i>Betula pendula</i>	08.06.2002	Berlin-Zehlendorf-3 (Berkaer Str.)	chlorotische Bänderungen	+	isometrische Partikel (30 nm)	+	1
38	E510	<i>Fraxinus excelsior</i>	14.06.2002	Bad Salzuflen	schwache chlorotische Linien entlang der Blattadern	-	-	-	-
39	E541	<i>Sambucus nigra</i>	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitter Str.)	starke chlorotische Ringflecken	+	-	+	1
40	E542	<i>Ulmus minor</i>	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitter Str.)	Chlorosen entlang der Blattadern (Blätter mit Blattläusen)	-	-	-	-
41	E543	<i>Laburnum anagyroides</i>	24.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)	Chlorosen an der Mittelrippe entlang , teilweise nach außen ausbreitend	-	nt	-	-
42	E544	<i>Carpinus betulus</i>	28.06.2002	Berlin-Zehlendorf-2 (Bitterstr.)	keine eindeutigen Symptome	-	nt	-	-
43	E566	<i>Betula pendula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorosen zw. Blattadern	-	starre Stäbchen (350 nm)	-	-
44	E567	<i>Fagus sylvatica</i>	28.06.2002	Niedereimer	flächige Chlorose zw. Blattadern	-	Bakterien	-	-
45	E568	<i>Sambucus nigra</i>	28.06.2002	Balve	chlorotische Ringflecken und Adernaufhellungen zwischen Adern	+	leicht flexible filamentöse Partikel (ca. 800 nm), isometrische Partikel	+	2
46	E569	<i>Crataegus monogyna</i>	28.06.2002	Balve	chlorotische Flecken, leicht verdickte Blätter	+	Bakterien, starre Stäbchen mit breitem Mittelkanal (250 nm, TRV), 400 nm lange flexible filamentöse Partikel	-	-
47	E570	<i>Malus sp.</i>	28.06.2002	Balve	chlorotische Ringflecken	-	-	-	-
48	E571	<i>Fraxinus excelsior</i>	28.06.2002	Balve	schwache Interkostal-Chlorose	-	starre Stäbchen mit Mittelkanal (400 nm)	-	-
49	E572	<i>Rubus idaeus</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken und Bänderungen	-	-	-	-
50	E573	<i>Rhamnus frangula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	schwache chlorotische Flecken	-	-	-	-
51	E574	<i>Betula pendula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotischen Flecken und Bänderungen	-	-	-	-
52	E575	<i>Aegopodium podagraria</i>	28.06.2002	Niedereimer	große chlorotische Ringflecken	-	isometrische Partikel (30 nm)	+	2

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
53	E576	<i>Sambucus nigra</i> = E140 (ein Jahr später)	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	+	starre Stäbchen mit Mittelkanal (400 nm), isometrische Partikel	+	2
54	E577	<i>Betula pendula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotische Bänderungen	-	flexible filamentöse Partikel (750 nm)	-	-
55	E578	<i>Carpinus betulus</i>	28.06.2002	Niedereimer	flächige Chlorose zwischen Blattadern, v.a. am Blattrand	-	-	-	-
56	E579	<i>Betula pendula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	-	-	-	-
57	E580	<i>Betula pendula</i>	28.06.2002	Fellinghausen	chlorotische Ringflecken	-	-	-	-
58	E581	<i>Fraxinus excelsior</i>	29.06.2002	Neuruppin/ Linum	Adernaufhellung	-	-	-	-
59	E582	<i>Rhamnus frangula</i>	29.06.2002	Neuruppin/ Linum	Adernaufhellung	-	-	-	-
60	E583	<i>Sambucus nigra</i>	29.06.2002	Neuruppin/ Linum	Adernaufhellung und chlorotische Ringflecken	+	isometrische Partikel	+	2
61	E598	<i>Ulmus laevis</i>	11.07.2002	Berlin-Malchow	Ringflecken	-	-	-	-
62	E601	<i>Sambucus nigra</i>	07.07.2002	Berlin-Zehlendorf-4	Aufhellung zw. Blattadern	-	-	-	-
63	E602	<i>Aegopodium podagraria</i>	07.07.2002	Berlin-Zehlendorf-4	große chlorotische Ringflecken	-	Bakterien	-	-
64	E603	<i>Sambucus nigra</i>	08.07.2002	Werder	Aufhellungen zw. Blattadern	+	-	+	2
65	E610	<i>Betula pendula</i>	16.07.2002	Dresdner Heide	chlorotische Ringe	-	nt	-	-
66	E622	<i>Sambucus nigra</i>	19.07.2002	Berlin-Zehlendorf-5 (Lentzeallee 75)	Adernaufhellung, teilw. Im Interkostalbereich zw. Adern fast weiß	-	flexible filamentöse Partikel, isometrische Partikel	+	2
67	E640	<i>Rhamnus frangula</i>	31.07.2002	Klövensteen	chlorotische Bänderungen	-	-	-	-
68	E641	<i>Betula pendula</i>	31.07.2002	Klövensteen	chlorotische Bänderungen	-	-	-	-
69	E645	<i>Betula pendula</i>	03.08.2002	Vaals/ NL	Chlorosen	-	nt	-	-
70	E646	<i>Betula pendula</i>	02.08.2002	Aachen	Chlorosen	-	nt	-	-
71	E667	<i>Betula pendula</i>	09.09.2002	Berlin-Treptower Park	chlorotische Ringflecken	-	nt	-	-
72	E676	<i>Sambucus nigra</i>	24.09.2002	Helgoland	chlorotische Ringflecken	+	flexible filamentöse Partikel (600-750 x 20-22 nm)	+	2
73	E678	<i>Fraxinus excelsior</i>	07.10.2002	Andechs	chlorotische Scheckungen, leichte Ringe	-	-	+	1

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
74	E679	<i>Tilia platyphyllos</i>	07.10.2002	Freiburg	leichte Ringflecken und Bänderungen	-	-	-	-
75	E775	<i>Betula pendula</i>	29.01.2003	Neuseeland/ Lake Karapiro	schwache Interkostal-Chlorose	-	nt	-	-
76	E776	<i>Betula pendula</i>	29.1.2003	Neuseeland/ NapierBluff Hill	schwache Interkostal-Chlorose	-	nt	-	-
77	E836	<i>Betula nigra</i>	01.06.2003	Hannover- Herrenhausen	chlorotische Bänderungen	-	nt	+	2
78	E837	<i>Betula occidentalis</i>	01.06.2003	Hannover- Herrenhausen	chlorotische Sprenkel	-	-	-	-
79	E838	<i>Betula platyphylla</i> 'Japonica'	01.06.2003	Hannover- Herrenhausen	flächige Chlorose	-	-	-	-
80	E839	<i>Sambucus nigra</i>	17.06.2003	Berlin- Zehlendorf-4 (Lentzeallee 75)	chlorotische Ringflecken	+	flexible filamentöse Partikel	+	2
81	E896	<i>Betula pendula.</i>	30.06.2003	Berlin- Zehlendorf-6 (Thielallee)	chlorotische Bänderungen	-	nt	+	2
82	E912	<i>Ulmus leavis</i>	30.06.2003	Potsdam	chlorotische Ringflecken	-	nt	-	-
83	E950	<i>Sambucus nigra</i>	20.07.2003	Aschersleben	Starke chlorotische Scheckungen	+	nt	+	2
84	E951	<i>Betula pendula</i>	14.07.2003	Leamington Spa (UK)	chlorotische Bänderungen, nekrotische Stellen	-	nt	-	-
85	E952	<i>Ulmus</i> sp.	14.07.2003	Leamington Spa (UK)	starke chlorotische Bänderungen	-	nt	-	-
86	E957	<i>Forsythia intermedia</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
87	E958	<i>Corylus avellana</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
88	E959	<i>Fraxinus excelsior</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
89	E960	<i>Carpinus betulus</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
90	E961	<i>Aegopodium</i> <i>podagraria</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
91	E962	<i>Sambucus nigra</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
92	E963	<i>Fagus sylvatica</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A1:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Zeitpunkt der Probenahme	Herkunft	Symptome	Biotest	TEM	PCR	Klon
93	E964	<i>Prunus avium</i>	29.07.2003	Dachau/Süd	keine virustypischen Symptome	nt	nt	-	-
94	E1680	<i>Sambucus nigra</i>	22.04.2004	Berlin-Zehlendorf-4 (Lentzeallee 75)	chlorotische Ringflecken	nt	-	+	1
95	E1681	<i>Knoblauchrauke</i>	24.04.2004	Berlin-Zehlendorf-1 Lentzeallee Z	chlorotische Scheckungen	nt	-	-	-
96	E1682	<i>Sambucus nigra</i> = E119 (3 Jahre später)	24.04.2004	Berlin-Zehlendorf-1 Lentzeallee Z	chlorotische Ringflecken	nt	-	+	1
97	E1708	<i>Sambucus nigra</i>	17.05.2004	Kleinbeeren – Strauch 1	chlorotische Aufhellungen und Ringflecken	nt	nt	+	1
98	E1709	<i>Sambucus nigra</i>	17.05.2004	Kleinbeeren – Strauch 2	chlorotische Aufhellungen und Ringflecken	nt	nt	+	
99	E1718	<i>Sambucus nigra</i>	01.06.2004	Norton Lindsey	chlorotische Scheckungen	nt	nt	-	-
100	E1733	<i>Wisteria sinensis</i>	11.06.2004	Berlin-Rudow	chlorotische Ringflecken	nt	nt	-	-
101	E1745	<i>Betula pendula</i>	10.06.2004	Berlin-Zehlendorf-6 (Thielallee) = E896	deutliche chlorotische Bänderungen	nt	nt	+	1
102	E1746	<i>Sambucus nigra</i>	22.06.2004	Insel Poel	chlorotische Ringflecken	nt	nt	+	1
103	E1747	<i>Sambucus nigra</i>	22.06.2004	Wismar	chlorotische Ringflecken	nt	nt	-	-
104	E1765	<i>Cornus</i> sp.	14.07.2004	Kreutztal	chlorotische Flecken	nt	nt	-	-
105	E1766	<i>Betula pendula</i>	15.07.2004	Berlin-Zehlendorf-7 (ATW 5/1)	chlorotische Bänderungen	nt	nt	-	-
106	E1771	<i>Rheum rhabarbarum</i>	08.08.2004	Hamburg	chlorotische Ringflecke	+	flexible filamentöse Partikel (700 nm -750 nm x 18 nm), isometrische Partikel	+	1

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Tab. A2: Liste aller zur Verfügung gestellter Proben und Isolate, Eingangsnummer, Wirtspflanze, Herkunft, Lagerung, PCR-Ergebnisse, Anzahl der Klone zur Sequenzauswertung.

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Herkunft	Lagerung	PCR	Klone
107	E105	<i>Betula pendula</i>	O Klößenstein	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001	-	-
108	E106	<i>Betula pendula</i>	O Aurich	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001	-	-
109	E107	<i>Betula pendula</i>	O Flensburg	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001	-	-
110	E108	<i>Betula pendula</i>	O Bonn	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001	-	-
111	E109	<i>Fagus sylvatica</i>	O Kreuztal	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 05.03.2001	-	-
112	E110	<i>Betula pendula</i>	I Unbekannt	CaCl ₂ getrocknet, gesammelt am 08/91, auf C.q. am 7/99	-	-
113	E111	<i>Betula pendula</i>	I Klößenstein	tiefgefroren, gesammelt am 05/96; C.q., -20 °C	+	2 + PCR
114	E112	<i>Sambucus nigra</i>	O Denzlingen	tiefgefroren; Blattmaterial, -20 °C	-	-
115	E113	<i>Fagus sylvatica</i>	O Siebengebirge	tiefgefroren, gesammelt am 10/91; Blattmaterial, -20 °C	+	PCR
116	E114	<i>Sambucus nigra</i>	O Neue Heide	tiefgefroren, gesammelt am 16.06.2001; Blattmaterial, -20 °C	+	PCR
117	E115	<i>Fraxinus excelsior</i>	O Unbekannt	tiefgefroren, gesammelt am 06/98;	-	-
118	E154	<i>Juglans regia</i>	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 479. dió, 05.04.1983	-	2
119	E155	<i>Juglans regia</i> 'Hartley'	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 4/15/2, 16.11.1987	-	-
120	E156	<i>Juglans regia</i> 'Hartley'	I Transdanubien, (H)	CaCl ₂ -getrocknet, bei 4 °C gelagert, 6, 19.06.1984	+	PCR
121	E325	<i>Fraxinus excelsior</i>	I Schwäbische Alp	getrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	1
122	E326	<i>Juglans regia</i>	I Bonn-Oberkassel	getrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	1
123	E327	<i>Prunus avium</i>	I Bonn	getrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	1
124	E395	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I Bornheim	getrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	2
125	E648	<i>Juglans regia</i>	I F	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	2
126	E689	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Klößenstein	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 18.08.1992	-	-
127	E690	<i>Betula pendula</i>	O Harsefeld	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 19.08.1997	-	-
128	E691	<i>Fraxinus excelsior</i>	O Warendorf	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 28.06.1999	-	-
129	E692	<i>Rubus idaeus</i>	O Hauberg	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C, gesammelt am 09.09.1997	-	-
130	E693	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Neustadt/Titisee	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 18.06.2000	+	2
131	E694	<i>Cornus</i> sp.	O Klößenstein	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 09.06.2000	-	-

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A2:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Herkunft	Lagerung	PCR	Klone
132	E695	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Pinneberg	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 18.08.1997	+	2
133	E696	<i>Betula pendula</i>	O Klövensteen	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 11.05.1995, gleicher Baum wie E111	+	1
134	E697	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Osdorfer Born	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 04.05.1993	+	2
135	E698	<i>Fraxinus excelsior</i>	O Idar-Oberstein	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 09.06.1992	+	1
136	E699	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Recklingen	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C	-	-
137	E700	<i>Sorbus aucuparia</i>	O Neuenberg	mit flüssigem Stickstoff zermörstertes Blattmaterial, -20 °C; gesammelt am 12.07.1996	-	-
138	E797	<i>Cornus florida</i>	I USA	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, WATERWORTH & LAWSON (1992), JONES (1973), JONES (1976)	+	2
139	E798	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973)	-	-
140	E799	<i>Sambucus racemosa</i>	I Deutschland	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, GIERSEIPEN, (1993)	-	2
141	E800	<i>Juglans regia</i>	I UK	gefriergetrocknet C.q., Raumtemperatur	+	2
142	E801	<i>Ulmus americana</i>	I USA	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)	+	2
143	E802	<i>Rubus idaeus</i>	I NZ	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES <i>et al.</i> (1990)	+	2
144	E803	<i>Prunus avium</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)	-	-
145	E804	<i>Sambucus canadensis</i> 'Aurea'	I USA	gefriergetrocknet C.q., Raumtemperatur, JONES (1973), JONES (1976)	+	2
146	E805	<i>Rubus procerus</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, JONES (1976)	+	2
147	E806	<i>Betula pendula</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur	+	2
148	E1636	<i>Vitis vinifera</i>	O Neustadt/W.	bei 4 °C gelagertes Steckholz, gesammelt: 12/03	+	2
149	E1459	<i>Prunus avium</i> ; CLRV Keglers	I Ascherleben	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 30.10.1980,	-	-
150	E1460	<i>Prunus avium</i> , CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 27.01.1980, CROPLEY (1961)	-	-
151	E1461	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 20.07.1983, WALKEY (1973), SCOTT <i>et al.</i> (1992)	-	-
152	E1462	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 24.7.1983, WALKEY (1973), SCOTT <i>et al.</i> (1992), SCOTT <i>et al.</i> (1992)	-	-
153	E1463	<i>Populus nigra</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 20.12.1989	-	-
154	E1464	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 08.01.1990, Scott <i>et al.</i> (1992)	-	-
155	E1465	<i>Betula pendula</i> , I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 04.05.1988, Scott <i>et al.</i> (1992)	-	-
156	E1466	<i>Prunus avium</i> , CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 15.6.1976, Cropley (1961)	-	-

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Fortsetzung Tab. A2:

Nr.	Eingangsnummer	Natürliche Wirtspflanze	Herkunft	Lagerung	PCR	Klone
157	E1467	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 21.10.1991, Scott et al. (1992)	-	-
158	E1468	<i>Prunus avium</i> , CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 24.01.1984, CROPLEY (1961)	-	-
159	E1469	<i>Betula pendula</i> , I ₂ IFFLEY	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 19.02.1991	+	1
160	E1470	<i>Betula pendula</i> , I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 14.09.1992, SCOTT et al. (1992)	-	-
161	E1471	<i>Rheum rhabarbarum</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 25.11.1991, SCOTT et al. (1992)	+	3
162	E1472	<i>Prunus avium</i> , CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 29.03.1993, CROPLEY (1961)	+	1
163	E1473	<i>Betula pendula</i> , I ₂	I Oxford, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 17.02.1997, SCOTT et al. (1992)	-	-
164	E1474	<i>Juglans regia</i>	I UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 18.04.1994	-	-
165	E1475	Walkeys Rhubarb Virus 6, 762	I Wellesbourne, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 18.11.2003	-	-
166	E1476	<i>Prunus avium</i> , CH125	I East Malling, UK	gefriergetrocknet, C.q., Raumtemperatur, 12.11.2003, CROPLEY (1961)	+	1

Eingangsnummer; nt = nicht getestet, alle gelb hinterlegten Proben und Isolate wurden mittels IC-RT-PCR (2.10) positiv auf eine CLRV-Infektion getestet. nt: nicht getestet, +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, PCR: zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

Tab. A3: Cherry leaf roll virus-infizierte Proben und Isolate, die in die phylogenetischen Untersuchungen (3.10) einbezogen wurden. Die Tabelle beinhaltet Informationen über Bezeichnung, Erstautoren, eingesetztes Material, Original-Wirtspflanze, geographische Herkunft, Jahr der Isolierung bzw. Probenahme und EMBL-Nukleotidsequenz Datenbank-Nummer.

Nr.	Bezeichnung ¹	Isolat/ Feldprobe	Original- Wirtspflanze	Geographische Herkunft	Jahr	EMBL- Nummer ²
1	E120	I	Sand-Birke	Berlin-Spandau, Deutschland	2001	AJ877118
2	E121	O	Sand-Birke	Berlin-Zehlendorf-Bitterstr., Deutschland	2001	
3	E160	O	Sand-Birke	Berlin-Neukölln, Deutschland	2001	
4	E499	O	Sand-Birke	Berlin-Zehlendorf-Berkaer Str., Deutschland	2002	AJ877119
5	E896	O	Sand-Birke	Berlin-Zehlendorf-Thielallee, Deutschland	2003	AJ877120
6	E1746s	O	Sand-Birke	Berlin-Zehlendorf-Thielallee, Deutschland	2004	
7	E696	O	Sand-Birke	Klövensteen, Deutschland	1995	AJ877121
8	E111	I	Sand-Birke	Klövensteen, Deutschland	1996	AJ877122
9	E135	O	Sand-Birke	Fellinghausen, Deutschland	2001	
10	E806	I	Sand-Birke	Großbritannien	unbekannt	AJ877123
11	I ₂ -RNA-1 (SCOTT <i>et al.</i> , 1992)	I	Sand-Birke	Großbritannien	1984	S84124
12	I ₂ -RNA-2 (SCOTT <i>et al.</i> , 1992)	I	Sand-Birke	Großbritannien	1984	S84125
13	E1469 (I ₂ in SCOTT <i>et al.</i> , 1992)	I	Sand-Birke	Großbritannien	1991	AJ877124
14	E836s	O	Schwarz-Birke	Hannover-Herrenhausen, Deutschland	2003	AJ877125
15	E327	I	Süßkirsche	Bonn, Deutschland	1990	AJ877127
16	E803 (C in JONES, 1973, 1976)	I	Süßkirsche	Großbritannien	unbekannt	AJ877128
17	E1472 (CH125 in CROPLEY, 1960)	I	Süßkirsche	Großbritannien	1955	AJ877129
18	E114	O	Schwarzer Holunder	Bellingen, Deutschland		
19	E676s	O	Schwarzer Holunder	Helgoland, Deutschland	2002	AJ877130
20	E485	I	Schwarzer Holunder	Fischland, Deutschland	2002	AJ877131
21	E603	I	Schwarzer Holunder	Werder, Deutschland	2002	AJ877132
22	E583	I	Schwarzer Holunder	Neuruppin, Deutschland	2002	AJ877133
23	E119s	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf-Lentzeallee I, Deutschland	2001	AJ877134
24	E622s	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf-Lentzeallee II, Deutschland	2002	AJ877135
25	E839	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf-Lentzeallee II, Deutschland	2003	AJ877136
26	E541s	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf-Bitterstr., Deutschland	2002	AJ877137
27	E443	I	Schwarzer Holunder	Berlin-Neukölln, Deutschland	2002	AJ877138
28	E441	I	Schwarzer Holunder	Aschersleben, Deutschland	2002	AJ877139
29	E950s	O	Schwarzer Holunder	Aschersleben, Deutschland	2003	AJ877140
30	E568	I	Schwarzer Holunder	Balve, Deutschland	2002	AJ877141
31	E140	O	Schwarzer Holunder	Fellinghausen, Deutschland	2001	
32	E576	I	Schwarzer Holunder	Fellinghausen, Deutschland	2002	AJ877142
33	E492	O	Schwarzer Holunder	Sümeg, Ungarn	2002	AJ877143
34	PV-0276	I	Schwarzer Holunder	Siebensgebirge, Deutschland	unbekannt	AJ877144
35	E1680	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf II, Deutschland	2004	
36	E1682	O	Schwarzer Holunder	Berlin-Zehlendorf I, Deutschland	2004	
37	E1708	O	Schwarzer Holunder	Kleinbeeren, Deutschland	2004	
38	E1746	O	Schwarzer Holunder	Insel Poel, Deutschland	2004	
39	E804 (G in JONES, 1973, 1976)	I	Kanadischer Holunder	USA	1967	AJ877145
40	GAY	I	Walnuss	Gaydon, Großbritannien	unbekannt	AJ877126
41	E326	I	Walnuss	Bonn-Oberkassel, Deutschland	1990	AJ877146
42	E648	I	Walnuss	Frankreich		AJ877147
43	4WJUG	I	Walnuss	Großbritannien	unbekannt	AJ877148
44	E800	I	Walnuss	Großbritannien	unbekannt	AJ877149
45	E154	I	Walnuss	Transdanubien, Ungarn		
46	E156	I	Walnuss	Transdanubien, Ungarn	1984	AJ877150
47	CTIFL	I	Walnuss	Frankreich	unbekannt	AJ877151
48	Ludmila	I	Walnuss	Slovakei	unbekannt	AJ877152
49	W8-RNA-1 (BORJA <i>et al.</i> , 1995)	I	Walnuss	USA	1980	Z344265
50	W8-RNA-2 (BROOKS & BRUENING, 1995a)	I	Walnuss	USA	1980	CL24694
51	E697	O	Gemeine Eberesche	Osdrorfer Born, Deutschland	1993	AJ877153
52	E695	O	Gemeine Eberesche	Pinneberg, Deutschland	1997	AJ877154
53	E693	I	Gemeine Eberesche	Titisee-Neustadt, Deutschland	2000	AJ877155
54	E141	O	Hainbuche	Niedereimer, Deutschland	2001	AJ877156
55	E575	O	Giersch	Fellinghausen, Deutschland	2002	AJ877157
56	E325	I	Gemeine Esche	Schwäbische Alb, Deutschland	1987	AJ877158
57	E678	O	Gemeine Esche	Andechs, Deutschland		AJ888533
58	E698	O	Gemeine Esche	Idar/Oberstein		AJ888534
59	E113 (BEG in JONES <i>et al.</i> , 1990)	O	Rotbuche	Siebensgebirge, Deutschland	1992	AJ877159
60	E801 (E in JONES, 1973, 1976)	I	Amerikanische Ulme	USA	1970	AJ877160
61	E797 (D in JONES, 1973, 1976)	I	Blumen-Hartriegel	USA	1972	AJ877161
62	E802 (RUB in JONES <i>et al.</i> , 1990)	I	Himbeere	Neuseekand	1978	AJ877162
63	E805 (BB in Jones, 1976)	I	Brombeere	Großbritannien	1973	AJ877163
64	E1636	O	Weinrebe	Neustadt-W.-Königsbach, Deutschland	2001	AJ877164
65	E395	I	Rhabarber	Bornheim, Deutschland	1987	AJ877165
66	R25-RNA-1 (SCOTT <i>et al.</i> , 1992)	I	Rhabarber	Großbritannien	1983	S84126
67	E1771	O	Rhabarber	Hamburg	2004	-
68	Petunie (WERNER <i>et al.</i> , 1997a)	I	Petunie	Deutschland		X99828
69	Chinese chive (YAMASHITA & FUKUI, 2004)	I	Schnitt-Knoblauch	Japan	2004	AB168098
70	Rumex AGBC (YAMASHITA & FUKUI, 2004)	I	Kleiner Sauerampfer	Japan	2004	AB168099
71	Rumex acetosella (YAMASHITA & FUKUI, 2004)	I	Kleiner Sauerampfer	Japan	2004	AB168100
72	Kleidocerys resedae	I	Birkenwanze	Berlin-Zehlendorf-Thielallee	2004	
73	Polydrusus sp	I	Rüsselkäfer	Berlin-Zehlendorf-Thielallee	2004	

¹ Eingangsnummern. O: direkt aus der Feldprobe amplifizierte IC-RT-PCR-Produkte (Die E-Nummern für diese Proben haben in der EMBL-Datenbank ein „s“ für „original sample“ an die Bezeichnung angehängt). Die graue Markierung kennzeichnet Feldproben bzw. Isolate, von denen nicht die gesamte zum Vergleich in 3.10 herangezogene Sequenz von 380 Basen für die 3'UTR verfügbar ist. gelb hinterlegte EMBL-Nummer kennzeichnen die eigenen Proben- bzw. Isolatsequenzen, grün hinterlegte EMBL-Nummer kennzeichnen die zur Verfügung gestellten Isolate.

Abb. A1 (1): Symptombilder auf eine CLRV-Infektion untersuchter virusverdächtiger Blattproben verschiedener Gehölze und Stauden. Alle Proben erwiesen sich in der IC-RT-PCR als negativ für eine CLRV-Infektion mit Ausnahme von Giersch (a) und Weinrebe (h).

a) *Aegopodium podagraria* (E575), b) *Fagus sylvatica* (E446), c) *Syringa vulgaris* (E448), d) *Syringa vulgaris* (E448).+: CLRV-positiv, -: CLRV-negativ

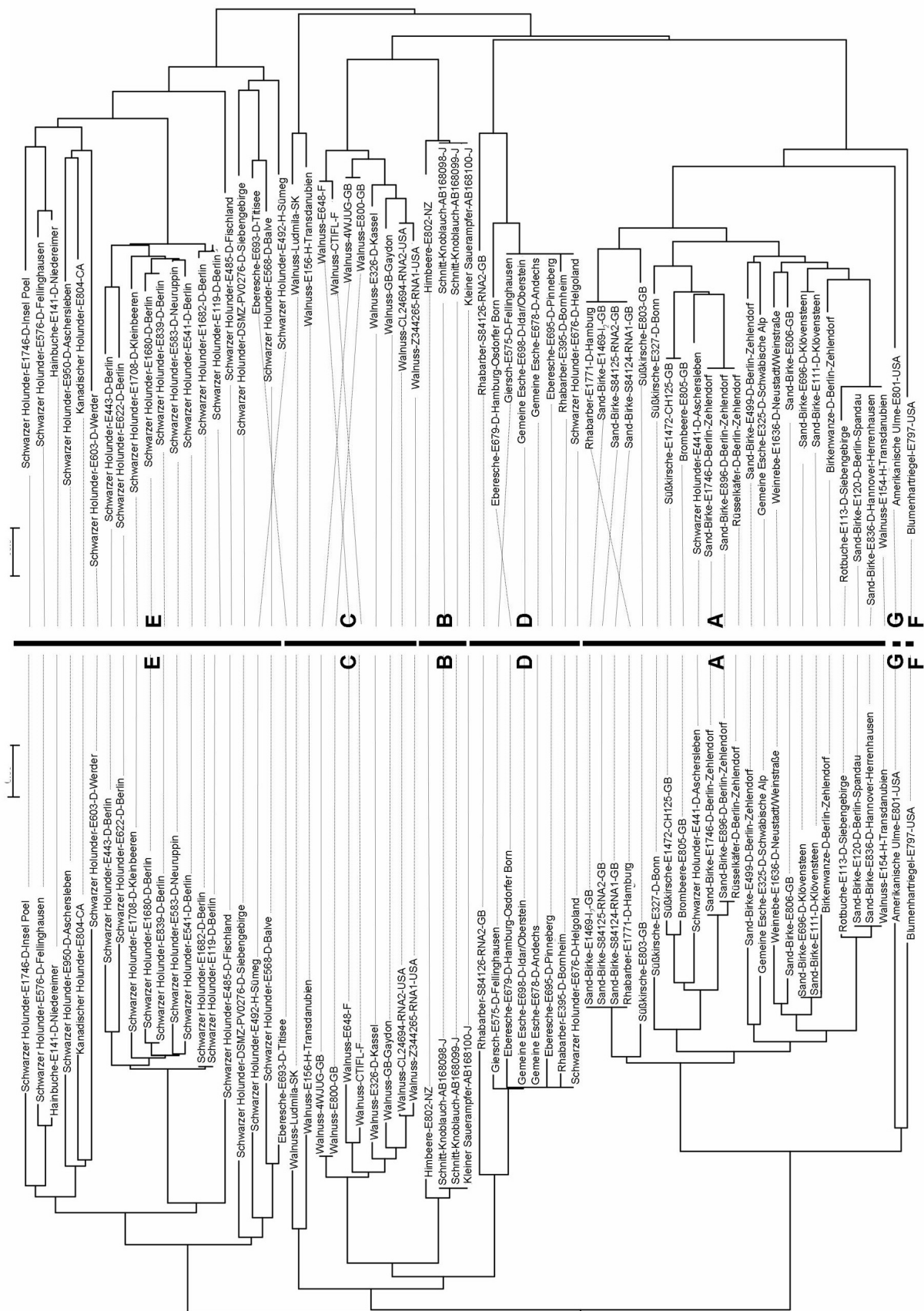


Abb. A1 (2): Symptombilder auf eine CLRV-Infektion untersuchter virusverdächtiger Blattproben verschiedener Gehölze und Stauden. Alle Proben erwiesen sich in der IC-RT-PCR als negativ für eine CLRV-Infektion mit Ausnahme von Giersch (a) und Weinrebe (h).

e) *Rubus idaeus* (E572), f) *Cornus* sp. (E1765), g) *Malus* sp. (E570), h) *Vitis vinifera* (E1636).+: CLRV-positiv, -: CLRV-negativ



Abb. A2: Phylogenetischer Stammbaumvergleich basierend auf 380 bp (unten) und 280 bp (oben) umfassenden Sequenzabschnitten im 3'-terminalen nicht-kodierenden hochkonservierten Genombereich von CLRV-Isolaten verschiedener Wirte und Herkünfte



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
SchwarzerHolunder-E950	ACAGTGT	TAAGTG	GACACTGG	TG	GTCTG	ACTGCAAT	CAGTACCAT	GCGACCG	GTCTTAGT	AGTAATAAG	AATACTAC	AGCCAA	GGGCTCC	GTGAGTT
KanadischerHolunder-E804	..C.	..G.T.G.G.C.C.
SchwarzerHolunder-E603	..T.	..A.TT.A.	..T.	..G.	..G.	..C.A.
SchwarzerHolunder-E576	..T.	..G.T.T.
Hainbuche-E141G.T.T.
SchwarzerHolunder-E1746G.T.T.	..G.	..G.A.
SchwarzerHolunder-E119A.T.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E1682A.	..T.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E622	..G.A.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E443T.	..A.	..T.A.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E541A.	..T.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E583	..G.A.	..T.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E839A.	..T.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E1680A.	..T.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E1708A.G.T.	..A.
SchwarzerHolunder-E485AA.TT.G.A.	..
SchwarzerHolunder-E568G.	..T.A.G.
Eberesche-E693G.	..T.G.
SchwarzerHolunder-DSMZG.	..T.
SchwarzerHolunder-E492CC.G.G.
Walnuss-2344265-RNA-1	..C.G.	..T.T.	..G.A.C.	..
Walnuss-CL24694-RNA-2	..C.G.	..T.T.	..G.C.	..
Walnuss-Gaydon	..C.G.	..T.T.	..G.A.C.	..
Walnuss-E326	..C.G.	..T.T.	..G.A.
Walnuss-E800	..C.G.	..T.T.	..G.A.
Walnuss-4WJUG	..C.G.	..T.T.	..G.A.
Walnuss-CTIFL	..C.G.	..T.T.	..G.A.
Walnuss-E648	..C.	..TGG.T.	..G.A.
KleinerSauerampfer-AB168100	..C.G.	..T.A.
KlainerSauerampfer-AB168099	..C.G.	..T.A.
SchnittKnoblauch-AB168098	..C.G.	..T.A.
Himbeere-E802	..C.G.	..T.A.
SchwarzerHolunder-E676G.	..T.CC.	..G.A.
Rhabarber-E395G.	..T.CC.	..G.A.
GemeineEsche-E678G.	..T.CC.	..G.A.
GemeineEsche-E698G.	..T.CC.	..G.A.
Eberesche-E697G.G.	..T.										

Abb. A3 (2): Sequenzvergleich 380 bp langer Sequenzen innerhalb der 3'UTR von 67 CLRV-Isolaten

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SchwarzerHolunder-E950	---TAGTTAACGAATATCTACTGCCATCCGTTGTAGTGAGTGGTGGTCCCTCTAT-CTTACTTGGTTATTGAACCGGG-CATGCTGGTAACATGCCTGTG									
KanadischerHolunder-E804	---G									
SchwarzerHolunder-E603	---C									
SchwarzerHolunder-E576	---T									
Hainbuche-E141	---T									
SchwarzerHolunder-E1746	---G T									
SchwarzerHolunder-E119	---C									
SchwarzerHolunder-E1682	---C									
SchwarzerHolunder-E622	---C									
SchwarzerHolunder-E443	---C									
SchwarzerHolunder-E541	---G									
SchwarzerHolunder-E583	---C									
SchwarzerHolunder-E839	---C									
SchwarzerHolunder-E1680	---T									
SchwarzerHolunder-E1708	---C									
SchwarzerHolunder-E485	---T									
SchwarzerHolunder-E568	---G T									
Eberesche-E693	---T									
SchwarzerHolunder-DSMZ	---T									
SchwarzerHolunder-E492	---T									
Walnuss-Z34265-RNA-1	---G									
Walnuss-CL24694-RNA-2	---G									
Walnuss-Gaydon	---G									
Walnuss-E326	---G									
Walnuss-E800	---T									
Walnuss-4WJUG	---T									
Walnuss-CTIFL	---AC									
Walnuss-E648	---AC									
KleinerSauerampfer-AB168100	---AA									
KleinerSauerampfer-AB168099	---AA									
SchnittKnoblauch-AB168098	---AA									
Himbeere-E802	---AA									
SchwarzerHolunder-E676	---A									
Rhabarber-E395	---A									
GemeineEsche-E678	---A									
GemeineEsche-E698	---A									
Eberesche-E697	---A									
Giersch-E575	---A									
Eberesche-E695	---A									
Rhabarber-S84126	---C									
Walnuss-E156	---T									
Walnuss-Ludmila	---T									
Suesskirsche-E1472	---AA									
Brombeere-E805	---AA									
SchwarzerHolunder-E441	---AA									
SandBirke-E896	---G									
Ruesselkaefer	---G									
SandBirke-E1733	---G									
SandBirke-E120	---G									
SchwarzBirke-E836	---G									
Walnuss-E154	---G									
Rotbuche-E113	---G									
SandBirke-E111	---AA									
SandBirke-E696	---AA									
Birkenwanze	---AA									
SandBirke-E806	---AA									
Weinrebe-D-E1636	---G									
Suesskirsche-E327	---AA									
SandBirke-E499	---GA									
GemeineEsche-E325	---AA									
SandBirke-S84124	---AA									
SandBirke-S84125	---AA									
SandBirke-E1469	---AA									
Rhabarber-E1771	---AA									
Suesskirsche	---AA									
BlumeHartriegel-E797	---GA									
AmericanischeUlm-E801	---GA									
Clustal Consensus	ATTTA	***	**	**	*****	**	*	**	*****	**

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
SchwarzerHolunder-E950	ATTTTGAATTC	CAAGCCCA	GAATTTAGG	GGGTATG	TGGGTAGAT	AGCGTTAG	CTAGG	GGGGTGT	TTTCGC	GATATTTGTTGCC	CCCATTTGTGTACAAA
KanadischerHolunder-E804	.C. GTG.	.T. A.								G.	
SchwarzerHolunder-E603	.A. .G.									G. A.	.CCC
SchwarzerHolunder-E576	C. . .T.				A.		A.			G.	
Hainbuche-E141	C. . .T.				A.					G.	
SchwarzerHolunder-E1746	C. . .T.				A.					G.	
SchwarzerHolunder-E119	C. . .TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E1682	C. . .TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E622	C. . .TT	.T. .		G. .GT						G. .A.A. .C.	
SchwarzerHolunder-E443	C. . .C.TT			T						G. .A.A. .CCC	
SchwarzerHolunder-E541	C. . .C.TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E583	C. . .C.TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E839	C. . .C.TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E1680	C. . .C.TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E1708	C. . .C.TT			T						G.	
SchwarzerHolunder-E485										G.	
SchwarzerHolunder-E568	C. . . .		G. .	G. A.	A.		GG.A			G.	
Eberesche-E693	C. . . .		G. .	A.	A.					G.	
SchwarzerHolunder-DSMZ	ATT			A						G.	
SchwarzerHolunder-E492	.A. . .			T						G.	
Walnuss-Z344265-RNA-1	C. . .CTT				G. .G					G. A.	T.
Walnuss-CL24694-RNA-2	C. . .CTT				G. .G					G. A.	T.
Walnuss-Gaydon	C. . .CTT				G. .G					GC.A.	C.
Walnuss-E326	C. . .CTT		C. .		G. .G					G. A.	T.
Walnuss-E800	C. . .CTT				G. .G					GC.A.	T.
Walnuss-4WJUG	C. . .CTT				G. .G					GC.A.	T.
Walnuss-CTIFL	GC. . .CTT				G. .G					G. C.	T.
Walnuss-E648	C. . .CTT				G. .G					G. C.	T.
KleinerSauerampfer-AB168100	C. . .-TT						A.			G. A.	T.
KlainerSauerampfer-AB168099	C. . .-TT						A.			G. A.	T.
SchnittKnoblauch-AB168098	C. . .-TT						A.			G. A.	T.
Himbeere-E802	C. . .A. -TT						A.			G. A.	T.
SchwarzerHolunder-E676	C. C. T. -		G. C.		G.					G. A.	T.
Rhabarber-E395	C. C. T. -		G. C.		G.		C.			G. A.	T.
GemeineEsche-E678	C. C. T. -		G. C.		G.					G. A.	T.
GemeineEsche-E698	C. C. T. -		G. C.		G.					G. A.	T.
Eberesche-E697	C. C. T. -		G. C.		G.		C.			G. A.	T.
Giersch-E575	CC.C. T. -		G. C.		G.					G. A.	T.
Eberesche-E695	C. C. T. -		G. C.		G.					G. A.	T.
Rhabarber-S84126	C. . .T.-T		C. .	A.	G.		A.			G. AA.	T.
Walnuss-E156	CC. .C.T			A.		A.				G. A.	T.
Walnuss-Ludmila	CC. .C.T				A.					G. A.	T.
Suesskirsche-E1472	C. . .C.		T.		G. .	A.		A. A.		GA. C. GT.	T.
Brombeere-E805	C. . .C.		T.		G. .	A.		A. A.		GA. C. GT.	T.
SchwarzerHolunder-E441	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. C. GT.	T.
SandBirke-E896	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
Ruesselkaefer	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
SandBirke-E1733	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
SandBirke-E120	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
SchwarzBirke-E836	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
Walnuss-E154	C. . .C.		T.			A.		A. A.		GA. CAGT.	T.
Rotbuche-E113	C. . .C.		T.								

Abb. A3 (4): Sequenzvergleich 380 bp langer Sequenzen innerhalb der 3'UTR von 67 CLRV-Isolaten

	310	320	330	340	350	360	370	380
SchwarzerHolunder-E950	ATTCGCTTATGTATGAGTGTCTGGACTCAAGCAGTGT	TTAGGTTTA	TTCTCT	TTGATTAAATGTTTACTTT	AGTTTT			
KanadischerHolunder-E804								
SchwarzerHolunder-E603								
SchwarzerHolunder-E576		A						
Hainbuche-E141								
SchwarzerHolunder-E1746								
SchwarzerHolunder-E119								A
SchwarzerHolunder-E1682								A
SchwarzerHolunder-E622								A
SchwarzerHolunder-E443								A
SchwarzerHolunder-E541								A
SchwarzerHolunder-E583								A
SchwarzerHolunder-E839								A
SchwarzerHolunder-E1680								A
SchwarzerHolunder-E1708								A
SchwarzerHolunder-E485								
SchwarzerHolunder-E568								
Eberesche-E693								
SchwarzerHolunder-DSMZ								A
SchwarzerHolunder-E492								
Walnuss-Z344265-RNA-1			G			G		A
Walnuss-CL24694-RNA-2			G			G		A
Walnuss-Gaydon			G					A
Walnuss-E326			G					A
Walnuss-E800			G					A
Walnuss-4WJUG			G					A
Walnuss-CTIFL			G					A
Walnuss-E648			G					A
KleinerSauerampfer-AB168100								C
KlainerSauerampfer-AB168099								A
SchnittKnoblauch-AB168098								A
Himbeere-E802								A
SchwarzerHolunder-E676								A
Rhabarber-E395								A
GemeineEsche-E678								A
GemeineEsche-E698								A
Eberesche-E697								A
Giersch-E575								A
Eberesche-E695								AGT
Rhabarber-S84126								A
Walnuss-E156			G					A
Walnuss-Ludmila		A						A
Suesskirsche-E1472		T						A
Brombeere-E805		T						A
SchwarzerHolunder-E441		T						A
SandBirke-E896		T						A
Ruesselkaefer		T						A
SandBirke-E1733		T						A
SandBirke-E120		T						A
SchwarzBirke-E836		T						A
Walnuss-E154		T						A
Rotbuche-E113		T						A
SandBirke-E111		T						A
SandBirke-E696		T						A
Birkenwanze		T						A
SandBirke-E806		T						A
Weinrebe-D-E1636		T						A
Suesskirsche-E327		T						A
SandBirke-E499		T						A
GemeineEsche-E325		T						A
SandBirke-S84124		T						A
SandBirke-S84125		T						A
SandBirke-E1469		T						A
Rhabarber-E1771		T						A
Suesskirsche		T						A
BlumeHartriegel-E797		T						A
AmerikanischeUlme-E801		T						A
Clustal Consensus								

Abb. A4 (1): Nukleotidsequenz der Hüllproteinregion von 9 verschiedenen CLRV-Isolaten

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Holunder-E804-CP	TCTG	TATCACACCGGGT	TATGCATTGGTCCG	CAGCCAGCCGCTTTTAAGT	TGTGCTGCGGAGGCGGCGGAGAA	TTCATCTTGGCTCGT	TGGTCCCTTCGTT			
Holunder-E603-CP										
Walnuss-E648-CP	.A.	.G.ACT.	.CA.C.	.T.		.A.		.G.	.C.	.T.G.C.
Walnuss-E326-CP	.G.	.ACT.	.CA.C.	.T.					.C.	.T.G.C.
Walnuss-Wsp-CP	.A.	.ACT.	.CA.C.	.T.		.A.A.		.T.		.T.G.C.
Walnuss-W8-CP	.A.	.ACT.	.CA.C.	.T.		.A.			.C.C.	.T.G.C.
Walnuss-WOxCP	.A.	.ACT.	.CA.C.	.T.		.A.			.C.C.	.T.G.C.
Walnuss-WRS-CP	.A.	.ACTG.	.CA.C.	.T.		.A.				.T.G.C.
Birch-I2-CP	.CA.G.A.	.T.T.	.T.	.G.	.T.	.C.	.T.A.	.T.A.A.	.A.A.C.C.	.G.C.
Clustal Consensus	**	*	*	**	*	*****	****	*****	*****	**
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Holunder-E804-CP	CTATTATTAGTGAAGGAGGG	GACTGATGCTTGGGTTAAGTGGCAGC	GCGGAACAGCGCACCACCTTTT	TGGTCGAGGGG	CAATATCGCCATGCTCTGTA	AAATAT				
Holunder-E603-CP										
Walnuss-E648-CP	.G.		.GA.C.		.G.A.	.T.	.A.T.	.CC.T.A.	.TG.C.	.G.
Walnuss-E326-CP	.G.		.GA.C.		.G.A.	.T.	.A.T.	.C.T.A.	.T.C.	.C.
Walnuss-Wsp-CP	.G.		.GA.T.	.C.	.G.A.	.T.	.A.T.	.C.T.A.	.T.	.G.
Walnuss-W8-CP	.G.		.GA.C.		.G.A.	.T.	.A.T.	.C.T.A.	.T.C.	.G.
Walnuss-WOxCP	.G.		.GA.C.		.G.A.	.T.	.A.T.	.C.T.A.	.T.C.	.G.
Walnuss-WRS-CP	.G.		.GA.C.		.A.A.	.T.	.A.T.	.C.T.A.	.T.C.	.G.
Birch-I2-CP			.GA.T.		.AC	.T.	.TTA.CG	.C.A.TACT	.T.C.T.	
Clustal Consensus	*	*****	*	*****	*****	*	*****	**	**	*****
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Holunder-E804-CP	TATGGCTGGTACTACCTGGG	TTAGTGTGTGATGCTTTTAATCGGG	CAAAACACTTAACAATTTTCTAGCGCTT	TGGGGCAAAATATGCCTCAGAGG						
Holunder-E603-CP										
Walnuss-E648-CP		.C.GT.A.		.C.C.C.C.C.	.G.G.T.	.T.		.T.C.		.C.AA
Walnuss-E326-CP		.C.GT.A.		.C.C.C.C.C.	.G.G.T.	.T.		.T.C.		.C.AA
Walnuss-Wsp-CP		.C.GT.A.C.		.C.C.C.C.C.	.G.G.T.	.T.		.T.C.	.C.	.C.AA
Walnuss-W8-CP		.C.GT.A.		.C.C.C.C.C.	.GG.G.T.	.T.	.C.	.T.C.		.C.AA
Walnuss-WOxCP		.C.GT.A.		.C.C.C.C.C.	.G.G.T.	.T.	.C.	.T.C.		.C.AA
Walnuss-WRS-CP		.C.AT.A.		.C.C.C.C.C.	.G.G.T.G.T.			.T.C.		.C.AA
Birch-I2-CP		.C.	.A.	.T.C.	.T.	.CT.T.	.TTA.G.T.C.	.TA.C.	.G.C.	.A
Clustal Consensus	*****	**	*	**	*****	**	*	*****	**	*****
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Holunder-E804-CP	GTGTTCCCATTTAGTAA	TCTCTGGAGAGAAATTTTAGCTTCTCCATGAGT	GAGTTATTGGGTTATACTATGCATCCCTATGCCACAGCATTGAGGATG							
Holunder-E603-CP										
Walnuss-E648-CP	.T.T.	.C.C.			.T.	.A.GC.A.A.		.TC.	.C.C.	.C
Walnuss-E326-CP	.T.T.	.C.			.T.	.A.GC.A.A.		.C.	.C.C.	.C
Walnuss-Wsp-CP	.T.	.C.			.T.	.A.GC.A.A.		.C.	.C.C.	.C
Walnuss-W8-CP	.T.	.C.			.T.	.A.GC.A.A.		.C.	.T.C.	.A
Walnuss-WOxCP	.T.	.C.			.T.	.A.GC.A.A.		.C.	.T.C.	.A
Walnuss-WRS-CP	.T.	.C.			.T.	.C.A.GA.A.G.		.C.	.C.C.	.C
Birch-I2-CP	.T.	.T.	.C.C.A.A.		.T.	.G.C.A.A.C.A.C.		.TC.G.A.	.C.	
Clustal Consensus	**	**	*	*****	*****	*	*	*****	**	*****
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Holunder-E804-CP	TACAATTCAATCTTTATGTTCTCA	CACTAATGATGTGCTTGCGCGGCTGAATGGGGAGGACACATTCTCTGGCAAA	TGAAGGACGAGCTTGCTTACC							
Holunder-E603-CP										
Walnuss-E648-CP	.G.T.	.C.	.T.C.	.C.T.	.T.	.G.T.	.G.	.T.	.T.	.G.T.C.TGA
Walnuss-E326-CP	.G.T.	.C.	.T.C.	.T.	.T.	.A.T.	.G.	.T.	.G.	.T.T.C.TGA
Walnuss-Wsp-CP	.G.T.	.C.	.T.C.	.T.	.T.	.A.T.	.G.	.T.	.G.	.T.T.C.TGA
Walnuss-W8-CP	.G.T.	.C.	.T.C.	.T.	.T.	.A.T.	.G.G.T.	.T.	.G.	.T.T.C.TGA
Walnuss-WOxCP	.G.T.</									

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

1510 1520 1530 1540

Holunder-E804-CP
Holunder-E603-CP
Walnuss-E648-CP
Walnuss-E326-CP
Walnuss-Wsp-CP
Walnuss-W8-CP
Walnuss-WOxCP
Walnuss-WRS-CP
Birch-I2-CP
Clustal Consensus

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus
1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
WalnuSS-W8-Z34265
WalnuSS-W8-RNA2-U24694
E603
Birke-I2-RNA1-S84124
Birke-I2-RNA2-S84125
Clustal Consensus

```

Abb. A5 (2): Sequenzvergleich der vollständigen 3'UTR von 3 CLRV-Isolaten

```

      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
Walnuss-W8-Z34265 GCGTCCTCCTTTATGACGTCATTGAATGGAGTATCACAACTTCTGGCGACCGTGTAACGGCAACAGTGTACGGTGACACTGGTGGGGCTGACTGCAATCA
Walnuss-W8-RNA2-U24694
E603      .T..T.A.--.....A.C.....-.....A.....T.....A.....
Birke-I2-RNA1-S84124      .T..A...TAA.....A.C..A.....-.....A.....AG..G.....C..
Birke-I2-RNA2-S84125      .T..A...TAA.....A.C..A.....-.....A.....AG..G.....C..
Clustal Consensus      **** * * * *      ***** * * * *      *****      *****      * *      *****

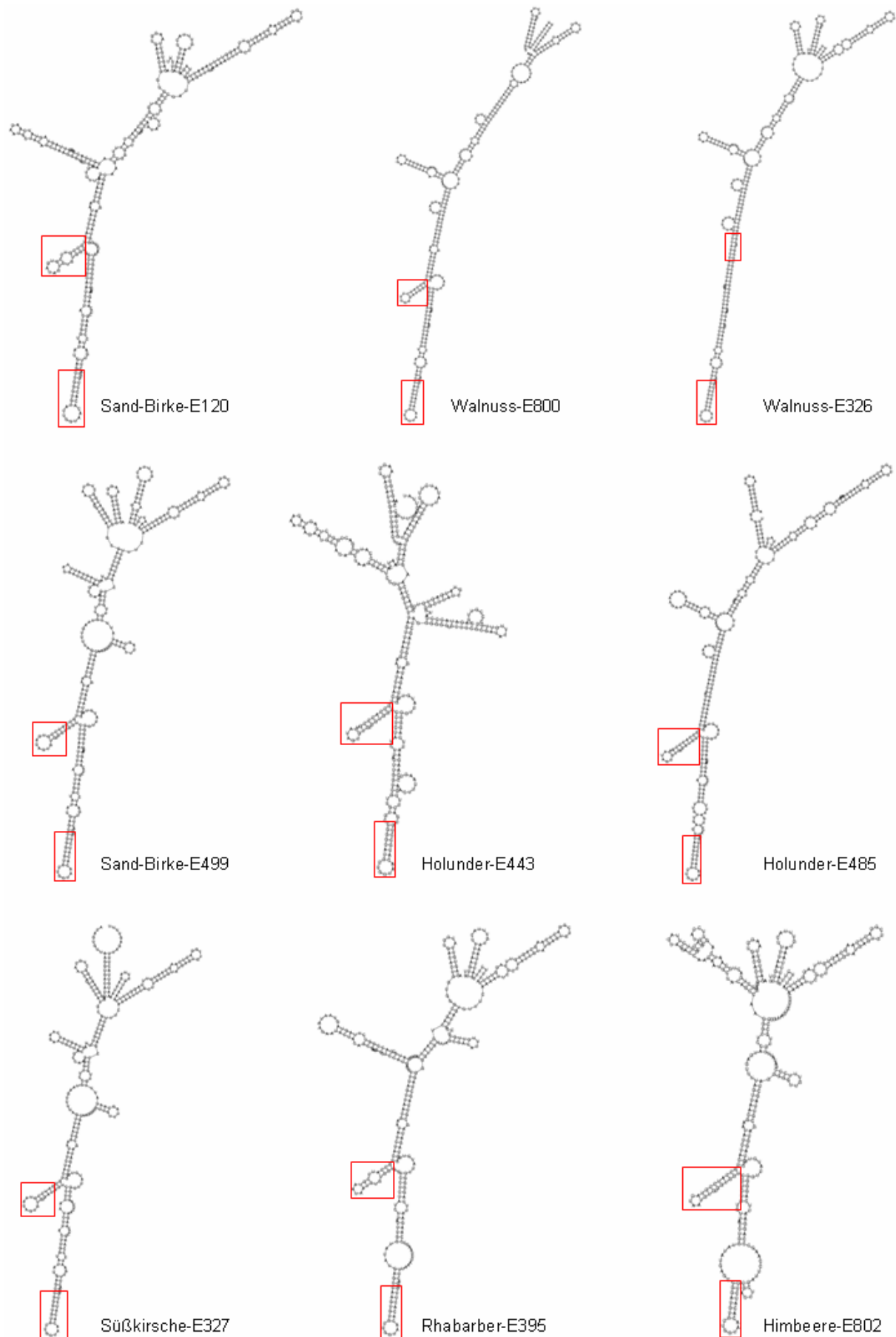
      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
Walnuss-W8-Z34265 GTTCCATGCGACCGGCTCTTAGTAGTATTAAGAATGCTACAGCCAAGGGCTCCATGAGTTCTAGTTAACGAGTATCTACTGCCATCCAT-----GCGA
Walnuss-W8-RNA2-U24694
E603      .T.....A.....G.....C.....G.....AT.....A.....C..G..TATAGTGT..T.G
Birke-I2-RNA1-S84124      T.....C.....T.....T.....G..A.....T.....A.....G..AATAGTGT..T.G
Birke-I2-RNA2-S84125      T.....C.....T.....T.....G..A.....T.....A.....G..AATAGTGT..T.G
Clustal Consensus      * *      ***** * *      *****      ***** * * * *      *****      *****      * *      * *

      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
Walnuss-W8-Z34265 TGGTCCTCTATCTTGCCCTGGTATATGAGCCAGGTGTGCTGGTAACACACCTGTGACTTTGAATCTTAAGCCCCAAGAATTAGGGGGTTATGTGGGTAGGT
Walnuss-W8-RNA2-U24694
E603      .T.....A.T...TAC.....G..CA.....TG..C....A....G..TCC.....A.
Birke-I2-RNA1-S84124      .T.....A.T.....G.....T.....CC.....A.
Birke-I2-RNA2-S84125      .T.....A.T.....G.....T.....CC.....A.
Clustal Consensus      ***** * * * *      ***** * *      *****      * *      *****      *****      ***** *

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
Walnuss-W8-Z34265 AGCGTTGGCTAGGGGGTTGTTTCGCGATATTGTTGCCCGGTTAGTGTTCAAAATTCGCTTATGTATGAGTGTCCGACTCAGGCAGTGTAGGTTTT
Walnuss-W8-RNA2-U24694
E603      .A.....T.....A.....A.....
Birke-I2-RNA1-S84124      .A..A.....A..A.....A.C.GT.....T.....A.....C.....
Birke-I2-RNA2-S84125      .A..A.....A..A.....A.C.GT.....T.....A.....C.....
Clustal Consensus      ***** * *      ***** * *      ***** * *      *****      *****      *****

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
Walnuss-W8-Z34265 A--TTTCCTTTGATTAGATGTTTACTTTAAG--TTTCCTTTTACGTAATCTTTCGACGC--
Walnuss-W8-RNA2-U24694
E603      .--.....C.....A.....T.--.....AATC
Birke-I2-RNA1-S84124      .AA..GT..A.....A.....T..AG.....
Birke-I2-RNA2-S84125      .AA..GT..A.....A.....T..AG.....
Clustal Consensus      * * * *      *****      *****      *****
```

Abb. A6: RNA-Sekundärstruktur von verschiedenen CLRV-Sequenzen innerhalb der 3'UTR (380 bp)



Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die mich und meine Arbeit unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dr. C. Büttner bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung des Themas und für Rat und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Obermeier für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für seine unendliche Geduld. Seine Erfahrungen und sein Ideenreichtum gaben mir stets Anregungen und motivierten mich immer wieder von neuem.

Außerdem danke ich Frau Dr. Susanne von Barga, die jeder Zeit für Fragen offen stand. Es war immer eine Freude Diskussionen anzuregen.

Bei Jana Gentkow möchte ich mich für die netten Stunden in gemeinsamer Arbeit bedanken. Sie war immer ein beruhigender Ausgleich und eine angenehme Unterstützung. Jana Eckert danke ich für die große Unterstützung und Hilfe sowohl bei fachlichen als auch persönlichen Fragen. Auch Sylvia Kleta, Sabine Hahn und Ines Schadock danke ich besonders für die vielen netten gemeinsamen Stunden vor und nach der Arbeitszeit.

András Petrik danke ich für die Hilfe bei der ungarischen Übersetzung der Zusammenfassung. Das war eine interessante Bereicherung.

Allen Mitarbeitern des Fachgebietes für Phytomedizin, die mich unterstützt haben, sei herzlich gedankt.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine ganze Familie für den seelischen Beistand, Geduld, Hilfe und Rücksicht in jedweder Form.

Lebenslauf

Name: Kathrin Rebenstorf
Anschrift: Aarauer Str. 38
12205 Berlin

Geburtsdatum: 16. Juli 1977
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 bis 1989: Johannes-Tews-Grundschule in Berlin
1989 bis 1996: Werner-von-Siemens-Oberschule in Berlin
Juni 1996: Abitur

Hochschulstudium

Oktober 1996 bis Juli 2002: Studium der Gartenbauwissenschaften an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

August 1998 bis Juni 1999: Auslandsstudium an der Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem (Universität für Gartenbau und Lebensmitteltechnologie) in Budapest
Abschlussprüfung am Lehrstuhl für Gemüsebau und Phytomedizin

Juni 2002: Erlangung des akademischen Grades Diplom-Agraringenieurin für Gartenbau

Promotion

ab Juli 2002 an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ich Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Mittel angefertigt habe.

Kathrin Rebenstorf

Berlin, Juli 2005